

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
PROF. DR. FERDINAND HOFSTÄDTER  
KLINIKUM DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Bedeutung von Wachstumsfaktor-Rezeptortyrosinkinasen  
der EGFR-Familie bei Plattenepithelkarzinomen  
des Kopf-Hals-Bereichs**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Kathrin Brunner

2010



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
PROF. DR. FERDINAND HOFSTÄDTER  
KLINIKUM DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Bedeutung von Wachstumsfaktor-Rezeptortyrosinkinasen  
der EGFR-Familie bei Plattenepithelkarzinomen  
des Kopf-Hals-Bereichs**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Kathrin Brunner

2010

Dekan

1. Berichterstatter

2. Berichterstatter

Tag der mündlichen Prüfung

Prof. Dr. Bernhard Weber

Prof. Dr. Arndt Hartmann

PD Dr. Gero Brockhoff

25.08.2011

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Überblick und Epidemiologie .....	1
1.1.2. Ätiologie .....	1
1.1.3. Lokalisationen und Prognose .....	2
1.1.4. Präkanzerosen .....	4
1.1.5. Histopathologie .....	4
1.1.6. Multifokalität und Feldkanzerisierung .....	6
1.1.7. Molekulargenetik .....	7
<b>1.2. Die Rezeptoren der ErbB-Familie .....</b>	<b>11</b>
1.2.1. Struktur .....	11
1.2.2. Prinzipien der Signaltransduktion .....	11
1.2.3. Organdifferentielle und onkologische Bedeutung .....	14
1.2.4. Bedeutung der ErbB-Rezeptoren für HNSCC .....	15
<b>1.3. ErbB-Rezeptoren und therapeutische Aspekte .....</b>	<b>15</b>
1.3.1. Das Beispiel Mammakarzinom .....	15
1.3.2. Der EGF-Rezeptor als pharmakologischer Angriffspunkt .....	16
<b>1.4. Fragestellung .....</b>	<b>18</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Patientenkollektiv und Tumorgewebeproben .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2. Tissue Microarray (TMA)-Technik .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) .....</b>	<b>22</b>
2.3.1. Prinzip der FISH .....	22
2.3.2. Materialien und Geräte .....	23
2.3.3. Reagenzien und Lösungen .....	24
2.3.4. DNA-Sonden .....	25

2.3.5.	FISH-Färbeprotokoll .....	25
2.3.6.	Mikroskopie, FISH-Auszählung und digitale Bilderstellung.....	26
2.3.7.	Ergebnisevaluation und Auswertungskriterien .....	27
2.4.	Immunhistochemie (IHC).....	29
2.4.1.	Prinzip der IHC .....	29
2.4.2.	Immunhistochemische Färbung nach der Polymerkonjugatmethode EnVision™ .....	30
2.4.3.	Materialien und Geräte .....	30
2.4.4.	Reagenzien und Lösungen.....	30
2.4.5.	IHC-Färbeprotokolle .....	31
2.4.6.	Ergebnisevaluation und Auswertungskriterien .....	34
2.5.	Statistische Analyse.....	35
3.	ERGEBNISSE .....	37
3.1.	HNSCC-Kollektiv.....	37
3.1.1.	Immunhistochemische Färbung von HER1-4 .....	37
3.1.1.1.	Deskriptive Analyse .....	37
3.1.1.2.	Univariate Überlebensanalysen nach Cox-Regression .....	38
3.1.2.	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von HER1-4 .....	38
3.1.2.1.	Deskriptive Analyse .....	38
3.1.2.2.	Univariate Überlebensanalysen nach Cox-Regression .....	40
3.1.3.	Weitere Überlebensanalysen in Zusammenschau mit Assoziations- und Korrelationsuntersuchungen .....	43
3.1.3.1.	Univariate Analysen nach Kaplan-Meier .....	43
3.1.3.2.	Multivariate Analyse nach Cox-Regression.....	45
3.2.	OSCC-Kollektiv.....	50
3.2.1.	Immunhistochemische Färbung von HER1-4 .....	50
3.2.1.1.	Deskriptive Analyse .....	50
3.2.1.2.	Univariate Überlebensanalysen nach Cox-Regression .....	50
3.2.2.	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von HER1-4 .....	53
3.2.2.1.	Deskriptive Analyse .....	53
3.2.2.2.	Univariate Überlebensanalysen nach Cox-Regression .....	54
3.2.3.	Weitere Überlebensanalysen in Zusammenschau mit Assoziations- und Korrelationsuntersuchungen .....	55

3.2.3.1.	Univariate Analysen nach Kaplan-Meier .....	55
3.2.3.2.	Multivariate Analyse nach Cox-Regression.....	57
<b>3.3.</b>	<b>Vergleich von HNSCC- und OSCC-Kollektiv.....</b>	<b>61</b>
3.3.1.	Immunhistochemische und zytogenetische Ergebnisse im Vergleich .....	61
3.3.2.	Überlebensanalysen .....	62
3.3.2.1.	Univariate Analysen im Vergleich.....	62
3.3.2.2.	Multivariate Analysen im Vergleich .....	65
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>67</b>
4.1.	Kritische Betrachtung der angewandten Methoden.....	67
4.1.1.	TMA-Technik .....	67
4.1.2.	Immunhistochemie und FISH.....	68
4.2.	Fragestellung der Arbeit im Kontext der bisherigen Literatur.....	69
4.3.	Diskussion der Ergebnisse.....	71
4.3.1.	Untersuchung des HNSCC-Kollektivs .....	71
4.3.1.1.	Immunhistochemische Analyse von HER1-4 .....	71
4.3.1.2.	Zytogenetische Analyse von HER1-4.....	72
4.3.1.3.	Prognostische Bedeutung der untersuchten Parameter .....	74
4.3.2.	Untersuchung des OSCC-Kollektivs .....	77
4.3.2.1.	Immunhistochemische Analyse von HER1-4 .....	77
4.3.2.2.	Zytogenetische Analyse von HER1-4.....	79
4.3.2.3.	Prognostische Bedeutung der untersuchten Parameter .....	80
4.3.3.	Vergleichende Analyse von HNSCC- und OSCC-Kollektiv .....	83
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>86</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>100</b>

---

<b>7.1. TNM-Klassifikationen und Stadiengruppierung .....</b>	<b>100</b>
<b>7.2. Klassifizierung der zervikalen Lymphknoten .....</b>	<b>104</b>
<b>7.3. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
<b>PUBLIKATION .....</b>	<b>110</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>111</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>112</b>



## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs

#### 1.1.1. Überblick und Epidemiologie

Maligne Kopf-Hals-Tumoren spielen weltweit eine bedeutende Rolle. So machen sie in den USA insgesamt über sechs Prozent aller malignen Erkrankungen aus und man findet sie mit einer Inzidenz im Bereich von 500.000 pro Jahr auf Rang 6 der häufigsten Krebserkrankungen in der Welt. Der dominierende histologische Typ ist das Plattenepithelkarzinom [Curado et al., 2007; Hoffman et al., 1998; Stewart et al., 2003]. Diese Tumoren, die unter dem Oberbegriff HNSCC (head and neck squamous cell carcinomas) zusammengefasst werden, mit Hinblick auf spezielle molekulargenetische Aspekte, sind Gegenstand dieser Arbeit.

In den meisten Ländern steigt die Inzidenz bei beiden Geschlechtern an, wofür in erster Linie der zunehmende Tabak- und Alkoholkonsum der Gesellschaft verantwortlich gemacht wird.

In Deutschland stellt der Kehlkopf mit einer geschätzten Inzidenz von 2.800 Larynxkarzinomen pro Jahr bei Männern und von 450 bei Frauen die häufigste Lokalisation von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region dar. In der BRD sterben jährlich etwa 1.400 Männer und 200 Frauen an Kehlkopfkrebs.

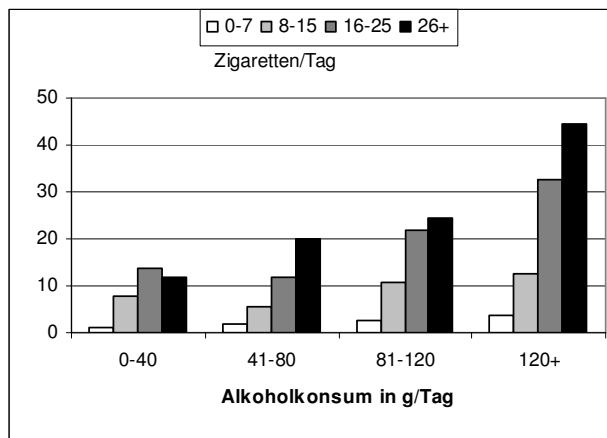
Die geschätzte jährliche Inzidenz der Mund- und Rachenkarzinome liegt bei Männern in Deutschland mit fast 7.800 etwa dreimal so hoch wie bei Frauen (knapp 2.600). Somit findet man maligne Tumoren des Mund- und Rachenraumes hierzulande bereits an siebter Stelle der häufigsten Krebserkrankungen beim männlichen Geschlecht. Die Zahl der jährlichen Krebssterbefälle für Karzinome des Mund- und Rachenraumes beträgt etwa 3.700 für Männer und knapp 1.000 für Frauen [Bertz et al., 2006; Becker et al., 1998; Curado et al., 2007].

Trotz aggressiver interdisziplinärer Therapieverfahren und medizinischen Fortschritten im Bereich der Radiochemotherapie hat sich die Prognose von HNSCC-Patienten in den letzten 30 Jahren nur unwesentlich verbessert [Bray et al., 2002].

#### 1.1.2. Ätiologie

Für das Larynxkarzinom und für Plattenepithelkarzinome des Mund- und Rachenraumes bestehen prinzipiell die gleichen Risikofaktoren, wobei insbesondere Tabakrauch und Alkoholkonsum als die wichtigsten zu nennen sind. Die Kombination der beiden Hauptrisikofaktoren erhöht das Risiko noch weiter (**Abbildung 1**). Verzicht auf Alkohol und Zigaretten könnte etwa 90 % der Larynx- und Hypopharynxkarzinome verhindern. In Indien, Teilen Südost-

asiens, China und Taiwan gilt auch Kautabak der Betelnuss als relevanter Risikofaktor für Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Oropharynx. Als weiterer Risikofaktor für



**Abbildung 1:** Relatives Risiko, an einem Larynxkarzinom zu erkranken, in Abhängigkeit von Tabakrauch und Alkoholkonsum (aus Barnes et al., 2005).

die Entwicklung von Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens gilt eine unzureichende Mundhygiene, während einer Ernährung reich an Obst und Gemüse protektive Effekte zugeschrieben werden.

Beim Larynxkarzinom wird ein Zusammenhang mit beruflicher Exposition durch Asbest, Nickel und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe beschrieben. In Deutschland kann Kehlkopfkrebs als Berufskrankheit anerkannt werden, wenn ein beruflicher Umgang

mit Asbest bestanden hat. Außerdem ist das Larynxkarzinom mit gastroösophagealem Reflux assoziiert.

Des Weiteren wird eine Beteiligung onkogener HP-Viren an der Genese der HNSCC diskutiert [Barnes et al., 2005; Bertz et al., 2006; Colditz et al., 1996]. Das Auftreten von HPV-DNA in HNSCC ist stark abhängig von der Tumor-Lokalisation. HPV-Assoziation wird in erster Linie bei Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx einschließlich der Tonsillenkarzinome beschrieben. Insbesondere Tumoren der Zungen- und Gaumenmandeln weisen mit 45 bis 64 % eine hohe HPV-Präsenz auf. Viel seltener stehen im Gegensatz dazu Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle, des Hypopharynx und des Larynx im Zusammenhang mit HP-Viren [Gillison et al., 2000; Klussmann et al., 2003; Paz et al., 1997; Ringström et al., 2002; Strome et al., 2002].

### 1.1.3. Lokalisationen und Prognose

#### Larynx:

Beim Larynxkarzinom werden entsprechend des primär betroffenen Kehlkopfkompartmentes supraglottische, glottische und subglottische Tumoren unterschieden, wobei die beiden erstgenannten Lokalisationen am häufigsten vertreten sind.

Das supraglottische Kompartiment ist reich an Lymphgefäßen und wird wie die nur gering lymphatisch versorgte Glottis in die oberen, mittleren und unteren jugulären Lymphknoten

(entsprechend der Level II, III und IV nach Robbins) drainiert. Der Lymphabfluss des subglottischen Kompartiments hingegen geht hauptsächlich über die paratrachealen Lymphknoten. Die beste Prognose unter den Larynxkarzinomen haben glottische Karzinome mit einer 5-JÜR von 80 bis 85 % (gemittelt über alle Stadien), gefolgt von supraglottischen Karzinomen (5-JÜR 65 bis 75%). Die Prognose einer subglottischen Lokalisation ist deutlich schlechter (5-JÜR um 40 %).

Primärtumorausdehnung und Lymphknoten-Status (entsprechend TNM-Klassifikation, siehe Anhang) stehen als prognostische Faktoren an erster Stelle. Im Gegensatz zur Ausbreitung in die regionären Lymphknoten ist eine hämatogene Fernmetastasierung viel seltener und tritt erst bei weit fortgeschrittener Erkrankung auf. Dies gilt auch für die nachfolgend beschriebenen anderen Tumorlokalisationen aus dem Spektrum der HNSCC.

### **Pharynx:**

Plattenepithelkarzinome des Hypopharynx entstehen meist im Sinus piriformis, gefolgt von Pharynxhinterwand und Postkrikoidregion und breiten sich häufig auf den Kehlkopf aus. Der Lymphabfluss erfolgt insbesondere über die jugulären Lymphknoten (Level II-IV) und die lateralen retropharyngealen Lymphknoten (sogenannte Rouvière-Lymphknoten). Hypopharynxkarzinome haben mit einer 5-JÜR von 20 bis 40 % eine besonders schlechte Prognose.

Die häufigste Lokalisation von Oropharynxkarzinomen ist die Zungenbasis (hinteres Drittel der Zunge). Weitere Lokalisationen sind die Tonsillen, die Tonsillargrube, die Oropharynxhinterwand sowie die Schleimhaut des weichen Gaumens einschließlich der Uvula. Tonsillenkarzinome (5-JÜR stadienabhängig 15 bis 100 %) sind prognostisch günstiger als Karzinome des Zungengrundes (5-JÜR stadienabhängig 5 bis 60 %).

### **Mundhöhle:**

Innerhalb der Mundhöhle sind die Lokalisationen für Karzinome vielfältig. Dazu gehören Wangenschleimhaut, Gingiva, harter Gaumen, die vorderen zwei Drittel der Zunge und der Mundboden, wobei der ventrolaterale Bereich der Zunge sowie der Mundboden mit am häufigsten vertreten sind. Die gleichfalls häufigen Plattenepithelkarzinome der Lippe treten fast ausschließlich im Bereich der Unterlippe auf. Die Prognose von Karzinomen der Mundhöhle (ohne Lippe) liegt bei einer 5-JÜR von 40 bis 60 % (gemittelt über alle Tumorstadien), während die 5-JÜR bei Tumoren der Lippe 90% beträgt. Als am häufigsten betroffene Lymphknoten bei Mundhöhlenkarzinomen sind die Level I (submentale und submandibuläre Lymphknoten) bis III zu nennen [Barnes et al., 2005; Österreichische Gesellschaft für chirurgische

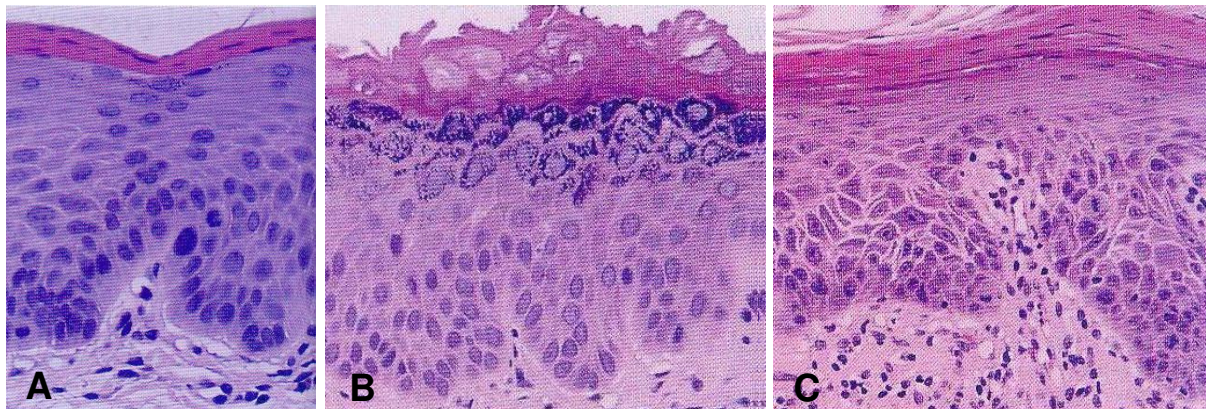
Onkologie]. Weitere Erläuterungen zu den genannten Lymphknotenstationen sind im Anhang aufgeführt.

#### 1.1.4. Präkanzerosen

Nur selten erfolgt die maligne Transformation auf dem Boden eines morphologisch unauffälligen Epithels. Den Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs gehen in den meisten Fällen nichtinvasive Vorstufen, sogenannte Präkanzerosen voraus. Diese können makroskopisch als Leukoplakie, Erythroplakie oder Erythroleukoplakie imponieren. Rein inspektorisch und palpatorisch sind Vorläuferläsionen und Plattenepithelkarzinome nicht zu unterscheiden. Die Grenzen zum frühen Karzinom sind fließend. Wie die HNSCC sind auch ihre Vorstufen streng mit Nikotin- und Alkoholabusus assoziiert [Barnes et al., 2005].

#### 1.1.5. Histopathologie

Histomorphologisch bestehen bei Präkanzerosen bereits Epithelveränderungen, die mit überdurchschnittlich hoher Wahrscheinlichkeit zum invasiven Karzinom entarten. Diesen Epithelveränderungen liegen Abweichungen hinsichtlich Zytologie und Epithelarchitektur zugrunde, gemeinhin unter dem Terminus Dysplasie beschrieben.

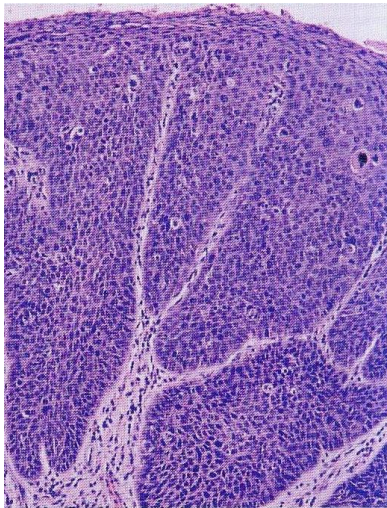


**Abbildung 2:** Präkanzeröse Epithelveränderungen des Plattenepithels: (A) Leichte Dysplasie: Architekturstörung auf unteres Epitheldrittel begrenzt. (B) Mittelgradige Dysplasie: Architekturstörung bezieht das mittlere Epitheldrittel mit ein. (C) Schwere Dysplasie: Architekturstörung erreicht oberes Epitheldrittel (aus Barnes et al., 2005).

Merkmale der zytologischen Atypie sind beispielsweise abnorme Variationen von Kerngröße, Kernform, Zellgröße und Zellform sowie pathologische Kern-Plasma-Relation, Hyperchromasie der Kerne und atypische Mitosefiguren. Irreguläre Epithelschichtung, Verlust der Aus-

richtung der Basalzellen, tropfenförmige Reteleisten, Steigerung der Mitosezahl, vorzeitige Keratinisierung in Einzelzellen (Dyskeratose) und Keratinperlen innerhalb der Retezapfen kennzeichnen die gestörte Plattenepithelarchitektur.

Nach WHO werden die prämaligen Vorstufen unter dem Terminus „epitheliale Präkursorläsionen“ zusammengefasst und von Plattenepithelhyperplasie über leichte, mittelgradige und schwere Dysplasie bis hin zum Carcinoma in situ klassifiziert. Daneben gibt es noch zwei



**Abbildung 3:** Carcinoma in situ (aus Barnes et al., 2005).

weitere akzeptierte Klassifikationsschemen (**Tabelle 1**). Die Histomorphologie unterschiedlich ausgeprägter epithelialer Präkursorläsionen ist in den **Abbildungen 2** und **3** dargestellt.

Ein Karzinom hat im Gegensatz zum Carcinoma in situ die Basalmembran durchbrochen und zeigt Invasion in tiefer gelegene Schichten. Meist treten infolge dessen stromale Begleitreaktionen wie Desmoplasie, Ablagerung extrazellulärer Matrix, Myofibroblastenproliferation sowie Neovaskularisationen auf. Angiolymphatische und perineurale Invasion sind weitere Zeichen der Malignität.

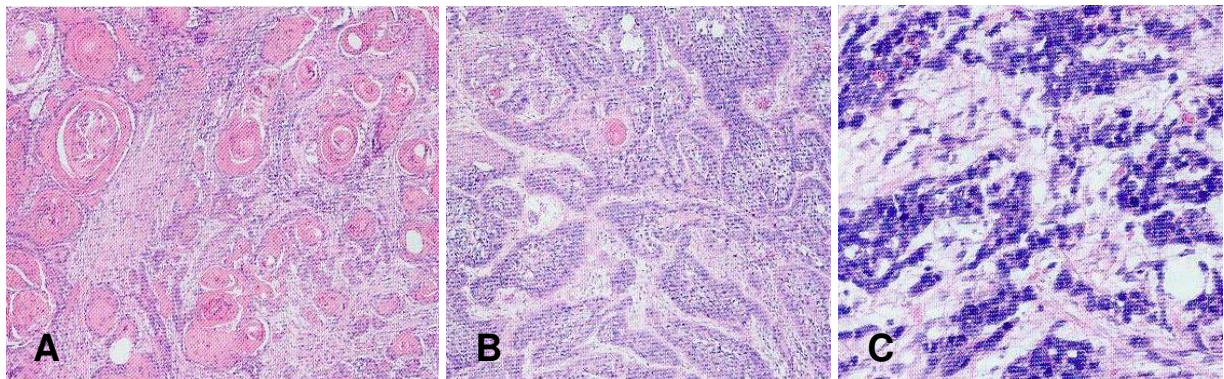
**Tabelle 1:** Klassifikationsschemen zur Einteilung prämaliger Vorstufen von HNSCC (aus Barnes et al., 2005)

WHO-Klassifikation 2005	Squamöse Intraepitheliale Neoplasie (SIN)	Ljubljana Klassifikation: Squamöse Intraepitheliale Läsion (SIL)
Squamöse Hyperplasie	-	Squamöse (einfache) Hyperplasie
Leichte Dysplasie	SIN I	Basalzell- und Parabasalzellhyperplasie
Mittelgradige Dysplasie	SIN II	Atypische Hyperplasie (Risikoepithel)
Schwere Dysplasie	SIN III	Atypische Hyperplasie (Risikoepithel)
Carcinoma in situ	SIN III	Carcinoma in situ

Hinsichtlich des Gradings unterscheidet man gut (G1), mäßig (G2) und schlecht differenzierte HNSCC (G3). Gut differenzierte HNSCC sind morphologisch dem normalen Plattenepithel



noch am nächsten. Mäßig differenzierte zeigen verstärkt nukleäre Polymorphismen, abnorme Mitosen und häufig eine geringere Verhornungstendenz. In schlecht differenzierten Karzinomen prägen unreife Zellen mit hoher Mitoserate sowie minimale Verhornung das Bild (**Abbildung 4**). Entgegen dem T-Stadium ist das Grading jedoch von eingeschränktem prognostischen Wert [Barnes et al., 2005].



**Abbildung 4:** (A) Gut differenziertes HNSCC. (B) Mäßig differenziertes HNSCC. (C) Gering differenziertes HNSCC (aus Barnes et al., 2005).

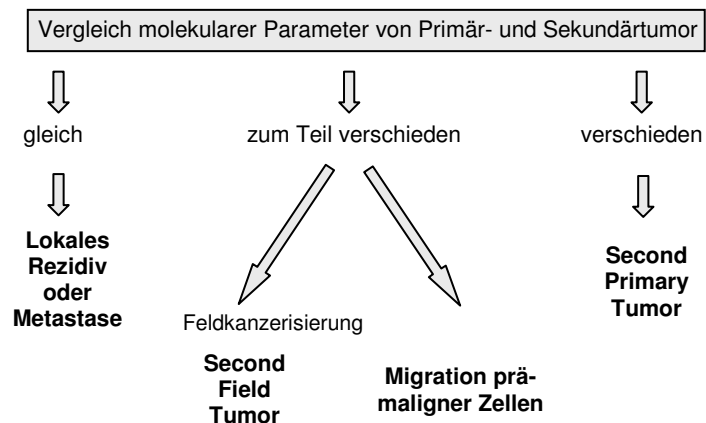
#### 1.1.6. Multifokalität und Feldkanzerisierung

In rund 11% der HNSCC werden multiple Karzinome beschrieben [Perez-Ordóñez et al., 2006]. Das Vorhandensein multipler, voneinander unabhängiger Tumoren bei abnormem Epithel der angrenzenden Schleimhaut hat zur Annahme des Konzepts der Feldkanzerisierung bei HNSCC geführt, erstmals beschrieben von Slaughter et al. Das Konzept beruht darauf, dass die Schleimhaut des aerodigestiven Trakts als Ganzes dem Einfluss von Karzinogenen ausgesetzt ist. Dadurch sollen genetisch veränderte „Felder“ entstehen, auf denen sich infolge unabhängiger weiterer genetischer Ereignisse multifokale Karzinome entwickeln können [Slaughter et al., 1953]. Trotz molekularer und genetischer Evidenz für dieses Konzept bleiben hinsichtlich der klonalen Verwandtschaft und der Art der Ausbreitung präneoplastischer und neoplastischer Läsionen, die in diesen Feldern entstehen sollen, Fragen offen. Eine weitere Hypothese zur Entstehung multifokaler Tumoren beinhaltet die Migration transformierter Zellen („klonale Expansion“) [Perez-Ordóñez et al., 2006].

Für Sekundärtumoren haben Braakhuis et al. eine neue Klassifikation dargelegt. Diese basiert auf dem Vergleich molekularer Parameter des Primär- und Sekundärtumors. Sie definierten Feldkanzerisierung als das Vorhandensein eines oder mehrer Schleimhautareale mit Epithelzellen, die genetische Veränderungen aufweisen. Ein „Feld“ bzw. eine „Feldläsion“ ist monoklonalen Ursprungs und zeigt weder Invasion noch Metastasierung. Auf diesen „Feldern“

können jedoch invasive (Sekundär-)Tumoren entstehen. Weisen diese den gleichen genetischen Ursprung mit vom Primärtumor unterschiedlichen zusätzlichen genetischen Veränderungen auf, handelt es sich um einen sogenannten „Second Field Tumor“. Davon sind jedoch Sekundärtumoren, die aufgrund von Migration prämaligener Zellen entstanden sind, molekulargenetisch nicht zu

unterscheiden. Unabhängig vom Konzept der Feldkanzerisierung werden lokale Rezidive, Metastasen und so genannte „Second Primary Tumoren“ (SPT) klassifiziert: Stimmen molekulare Parameter zwischen Primär- und Sekundärtumor überein, wird der Sekundärtumor je nach Lokalisation als Rezidiv oder Metastase definiert. Bei unterschiedlichen molekulargenetischen Eigenschaften wird hingegen der Sekundärtumor als „echter“ SPT klassifiziert (**Abbildung 5**) [Braakhuis et al., 2002]. Vor allem im Hinblick auf wachsende therapeutische Alternativen rückt die Kenntnis molekularer Mechanismen der Tumorigenese immer mehr in den Vordergrund.



**Abbildung 5:** Differenzierung von Sekundärtumoren anhand molekularer Parameter (nach Braakhuis et al., 2003 und Perez-Ordoñez et al., 2006).

### 1.1.7. Molekulargenetik

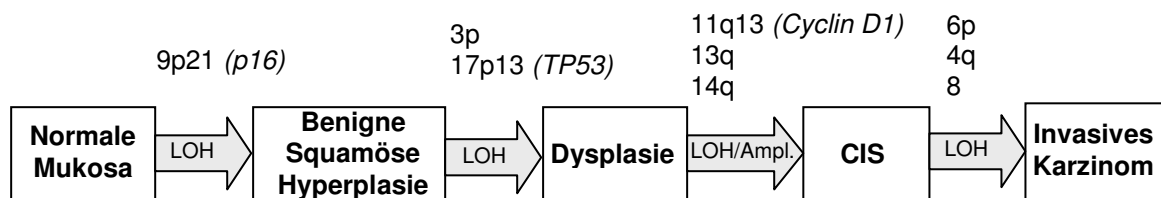
Krebsentstehung ist durch vielerlei Ereignisse auf molekularer Ebene gekennzeichnet, dazu gehören insbesondere Verlust der Zellzyklus-Kontrolle, Umgehen der Apoptose und Telomerase-Reaktivierung [Viallard et al., 2001; Weinberg, 2007].

Fehlregulationen innerhalb des Systems der Zellzyklusproteine bilden auch die Grundlage einer Mehrschritt-Karzinogenese auf dem Gebiet der HNSCC [Califano et al., 1996]. Den wichtigsten in HNSCC beobachteten molekularen Veränderungen liegen die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (TSG) zu Grunde. Genamplifikation und Überexpression von Onkogenen sowie Mutation und Deletion von TSG sind die wesentlichen Mechanismen [González et al., 1997; Hardisson, 2003; Miracca et al., 1999; Raybaud et al., 2003; Rodrigo et al., 1996(1); Yarbrough et al., 1994].

Die Inaktivierung einer Genkopie eines TSG kann z. B. durch Mutation oder durch epigenetische Prozesse wie Promotor-Methylierung erfolgen. Der Verlust/die Inaktivierung des zwei-

ten Allels ist meist Folge sogenannter LOH-Ereignisse, die im Vergleich zu Mutationen und Hypermethylierung der zweiten Genkopie viel häufiger stattfinden. LOH (Loss of Heterozygosity/Allel-Verlust) betrifft immer eine ganze Chromosomenregion und kann über verschiedene Mechanismen verursacht sein [Weinberg, 2007]. Bei HNSCC tritt LOH bzw. Allel-Imbalance besonders häufig auf den Chromosomenarmen 3p, 5q, 9q, 11q und 17p auf [Ah-See et al., 1994].

Califano et al. haben nicht nur invasive HNSCC, sondern bereits deren hyperplastische und dysplastische präkanzeröse Vorstufen auf LOH und Allel-Imbalance untersucht und anhand der Ergebnisse ein mögliches Modell im Sinne einer Mehrschritt-Karzinogenese dargelegt. Schon in hyperplastischen Schleimhautveränderungen kommen LOH auf 9p21, 3p21 und 17p13 vor. Die Häufigkeit von LOH auf 9p21 und 3p21 steigt mit dem Fortschreiten der Erkrankung zu Dysplasie und CIS weiter an. Zusätzlich weisen Dysplasien häufig LOH auf 11q13, 13q21 und 14q31 auf. Die Progression vom CIS zum invasiven Karzinom ist mit LOH auf weiteren Chromosomenabschnitten assoziiert (**Abbildung 6**). LOH auf vielen dieser Genloci korreliert folglich mit dem histopathologischen Fortschreiten der Erkrankung [Califano et al., 1996].



**Abbildung 6:** Modell zur Mehrschritt-Karzinogenese in HNSCC (nach Califano et al., 1996, mit Modifikationen nach Perez-Ordóñez et al., 2006 und Hardisson, 2003).

Die beschriebenen Regionen sind zum Teil Genorte bereits bekannter oder vermuteter TSG und Protoonkogene wie TP53 (17p) oder PRAD-1/Cyclin D1 (11q), also wichtiger Gene im Rahmen der Zellzyklusregulation [Ah-See et al., 1994].

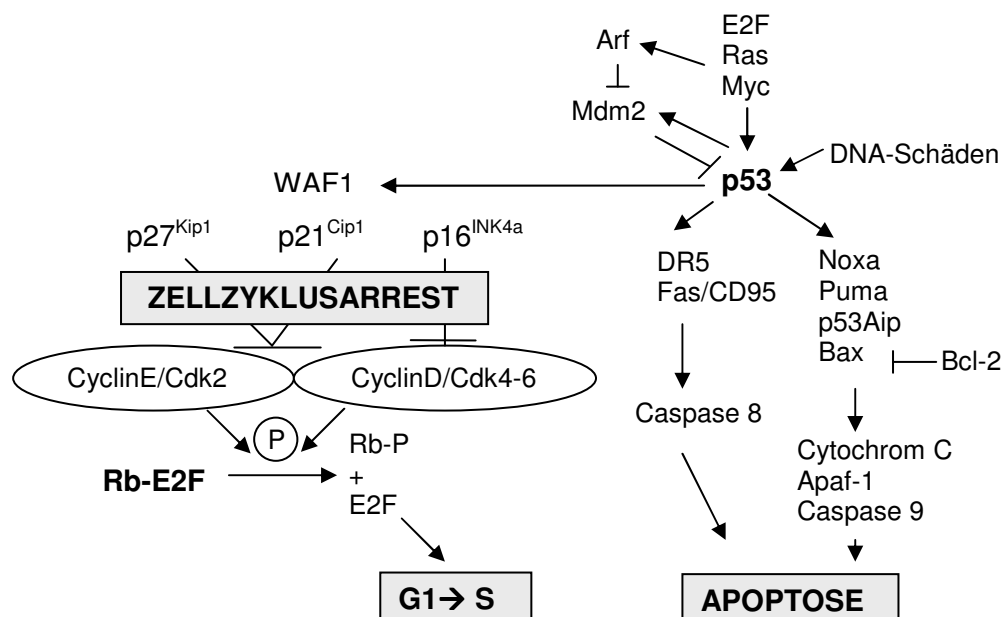
Für die Zellzyklus-Kontrolle sind hauptsächlich zwei Signalwege verantwortlich, in der zwei wichtige Tumorsuppressorgene respektive ihre Genprodukte eine Schlüsselrolle spielen: das TP53-Gen und das Retinoblastom-Gen (RB-Gen). Der Entwicklung von HNSCC wird die Fehlregulation eines oder beider Signalwege zugrunde gelegt [Raybaud et al., 2003].

**Abbildung 7** zeigt das komplexe Zusammenspiel der Tumorsuppressorgene RB und TP53 bzw. ihrer Genprodukte und ihr Einwirken auf die Zellzyklus-Regulation.



Bei der Progression des Zellzyklus, insbesondere an den wichtigen Kontrollpunkten G1/S und G2/M, nimmt eine Familie bestimmter Proteinkinasen, die sogenannten Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk), eine wichtige Stellung ein. Sie haben an ihren regulatorischen Untereinheiten die Cykline gebunden. Diese Cyclin-Cdk-Komplexe werden wiederum durch zwei Gruppen von Inhibitoren, den Cki, reguliert: die INK4-Familie und die CIP/KIP-Familie. Die Komplexe CyclinD-Cdk4/6 und CyclinE-Cdk2 bewirken die Passage von G1 nach S, indem sie Rb, das Genprodukt des Retinoblastomgens, phosphorylieren und somit dessen antiproliferative Aktivität ausschalten. Rb-Phosphorylierung führt zur Dissoziation des Rb/E2F-Komplexes. E2F stellt eine Familie von Transkriptionsfaktoren dar, die zur Transkription für die G1/S-Progression verantwortlicher Gene führt [Viallard et al., 2001; Weinberg, 2007].

Für HNSCC sind sowohl Rb-Verlust selbst als auch indirekte Alterationen im Rb-Signalweg, z. B. über Cyclin D1-Überexpression oder p16-Verlust, beschrieben. 37% der HNSCC sollen LOH des RB-Gens aufweisen, weitere 38% für das TP53-Gen und 22% für beide Gene [Raybaud et al., 2003].



**Abbildung 7:** Rolle der Tumorsuppressorproteine Rb und p53 bei der Zellzyklusregulation (nach Raybaud et al., 2003).

P53 kann über mindestens zwei Wege einen Zellzyklus-Arrest bewirken: zum einen über Aktivierung des WAF1-Gens mit nachfolgender Blockade von Cyclin-Cdk-Komplexen und zum anderen über Induktion des programmierten Zelltodes. Die Einleitung der Apoptose geschieht über die Expression der Proteine Bax, Noxa, Puma und p53Aip, die an der mitochondrialen Membran wirken. Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom C und zur Aktivierung der

Caspase 9 via Apaf 1. P53-vermittelte Apoptose kann des Weiteren über so genannte Todesrezeptoren, wie DR5, Pidd und Fas/CD95 induziert werden [Raybaud et al., 2003; Viallard et al., 2001].

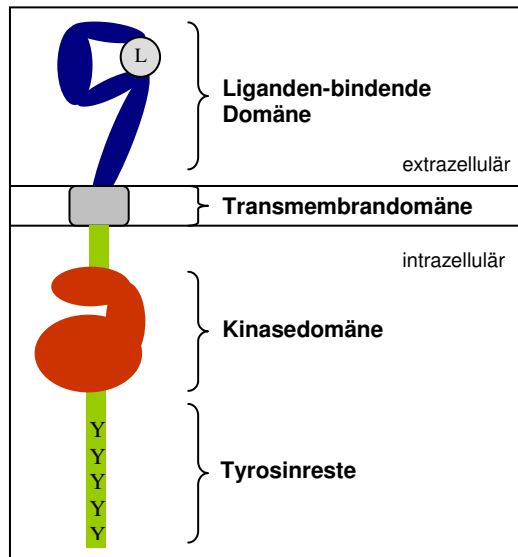
Die Mehrzahl der menschlichen Krebserkrankungen weist genetische Veränderungen auf, die mit einem Verlust der normalen Funktion des TP53-Tumorsuppressorgens einhergehen. TP53 ist auf Chromosom 17p13.1 lokalisiert und besteht aus 11 Exons [Wallace-Brodeur et al., 1999; Weinberg et al., 2007]. TP53-Mutationen werden häufig bei Tabak-assoziierten Krebserkrankungen beobachtet [Boyle et al., 1993; Greenblatt et al., 1994; Hussain et al., 1998]. Auch bei HNSCC gehört das TP53-Gen zu den am umfassendsten untersuchten Genen [Nagai, 1999; Raybaud-Diogenè et al., 1996]. Etwa 60% der HNSCC sollen p53-Überexpression infolge mutationsbedingter Akkumulation aufweisen, wobei überwiegend Missense-Mutationen auftreten [Boyle et al., 1993; Field et al., 1993; Hardisson, 2003; Raybaud-Diogenè et al., 1996; Scully et al., 2000]. Vielfach wurde immunhistochemisch die p53-Expression untersucht und auf prognostische Marker bezogen. P53-Expression soll mit einer schlechteren Prognose assoziiert sein [Hardisson, 2003; Koch et al., 1996; Raybaud et al., 2003]

Ein weiteres Molekül, das möglicherweise bei der Zellzyklusregulation eine entscheidende Rolle einnimmt, ist das Ki-67-Protein (pKi67). Es besitzt eine FHA (Forkhead Associated)-Domäne und weist damit strukturelle Gemeinsamkeiten zu anderen Proteinen der Zellzyklusregulation auf. Charakteristisch für pKi67 ist sein komplexes Lokisationsmuster innerhalb des Zellkerns, welches beim Durchlaufen des Zellzyklus eine Änderung erfährt. Obwohl über Struktur, Lokalisation und Regulation von pKi67 viel bekannt ist, weiß man noch wenig über dessen genaue Funktion. Eine Rolle bei der Ribosomensynthese während der Zellteilung wird vermutet [Brown et al., 2002]. Da es in ruhenden Zellen nicht detektierbar ist, wird dem Ki-67-Protein eine wichtige Bedeutung für Proliferationsvorgänge zugeschrieben [Schwab, 2009]. Nicht nur bei HNSCC ist Ki-67 als Proliferationsmarker etabliert [Looi et al., 2008; Smilek et al., 2006].

Neben den beschriebenen Genen, die über ihre Genprodukte direkt in die Zellzyklusregulation involviert sind, gilt auch Genen, die für bestimmte Wachstumsfaktorrezeptoren kodieren, zunehmendes Interesse. Onkogen-Aktivierung auf den entsprechenden Chromosomenregionen kann verantwortlich für eine dysregulierte Signaltransduktion und schließlich für eine ungehemmte Proliferation sein. Gegenstand der Forschung der letzten 10 Jahre sind insbesondere die Wachstumsfaktorrezeptoren aus der Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen, der auch die Rezeptoren der ErbB-Familie angehören.

## 1.2. Die Rezeptoren der ErbB-Familie

### 1.2.1. Struktur



**Abbildung 8:** Struktureller Aufbau der ErbB-Rezeptoren (nach Riese et al., 2007).

Die ErbB-Familie/EGFR-Familie wird von vier evolutionsbiologisch verwandten Rezeptoren aus der Familie der Rezeptortyrosinkinasen gebildet: EGFR/HER1/ErbB1/c-erbB-1 und seine drei bekannten Homologen HER2/neu/ErbB2/c-erbB-2, HER3/ErbB3/c-erbB-3 und HER4/ErbB4/c-erbB-4. Die Bezeichnung ErbB leitet sich von der Strukturverwandtschaft des EGF-Rezeptors zum v-ErbB-Onkoprotein des aviären Erythroblastose-Virus (AEV) ab. Die humanen Formen dieser Transmembranglykoproteine mit einem Molekulargewicht im Bereich von 180 kD haben eine Größe von 1210 bis 1343 Aminosäuren. Der N-Terminus bildet das extrazelluläre Ende, die intra-

zelluläre Domäne endet C-terminal. Die Rezeptoren zeichnen sich durch viele strukturelle Gemeinsamkeiten auf molekularer Ebene aus. Sie besitzen jeweils eine Cystein-reiche extrazelluläre Liganden-bindende Domäne, eine hydrophobe Transmembrandomäne und eine große zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität sowie mehreren Tyrosinresten, die bei Rezeptor-Aktivierung phosphoryliert werden können (**Abbildung 8**) [Ullrich et al., 1990; Riese et al., 1998; Riese et al., 2007, O-charoenrat et al., 2002(1); O-charoenrat et al., 2002(2)]. Dem HER3-Rezeptor wird eine stark verminderte Tyrosinkinase-Aktivität zugeschrieben [Guy et al., 1994].

### 1.2.2. Prinzipien der Signaltransduktion

Rezeptor-Aktivierung setzt in der Regel die Bindung eines Liganden voraus. Es ist eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren bekannt, welche mit unterschiedlicher Spezifität und Affinität an ihre Rezeptoren binden. Die Liganden der EGFR-Familie werden entsprechend der Spezifität ihrer Rezeptorbindung in vier Gruppen eingeteilt [Sundaresan et al., 1998]. Liganden der ersten Gruppe binden nur an den EGFR. Zur zweiten Gruppe gehören Liganden, die an EGFR und HER4 binden. Neuregulin3, der nur an HER3 bindet, bildet die dritte Gruppe. Die vierte

Gruppe ist spezifisch für HER3 und HER4. Für HER2 ist bisher kein Ligand bekannt [Yarden et al., 1989; Sundaresan et al., 1998]. HER2 stellt also einen Orphan-Rezeptor dar.

**Tabelle 2** gibt eine zusammenfassende Übersicht über strukturelle Eigenschaften und Ligandenspezifität der einzelnen Rezeptoren der EGFR-Familie.

Neben der außerordentlichen Vielzahl an Liganden tragen noch zahlreiche andere Mechanismen zur Komplexität innerhalb des ErbB-Signallings bei. Insbesondere die Fähigkeit der Rezeptoren, untereinander in Wechselwirkung zu treten, spielt hierbei eine zentrale Rolle [Riese et al., 1998; Earp et al., 1995]. Durch Liganden-induzierte laterale Kommunikation der Rezeptoren in Form von Homo- und Heterodimerbildung (horizontale Signaltransduktion) wächst die Vielfältigkeit der Signalgebung [Riese et al., 1998; Jorissen et al., 2003]. Die Formation erfolgt zugunsten von Heterodimeren mit HER2 als bevorzugten Reaktionspartner [Graus-Porta et al., 1997; Karunakaran et al., 1996; Lenferink et al., 1998; Tzahar et al., 1996].

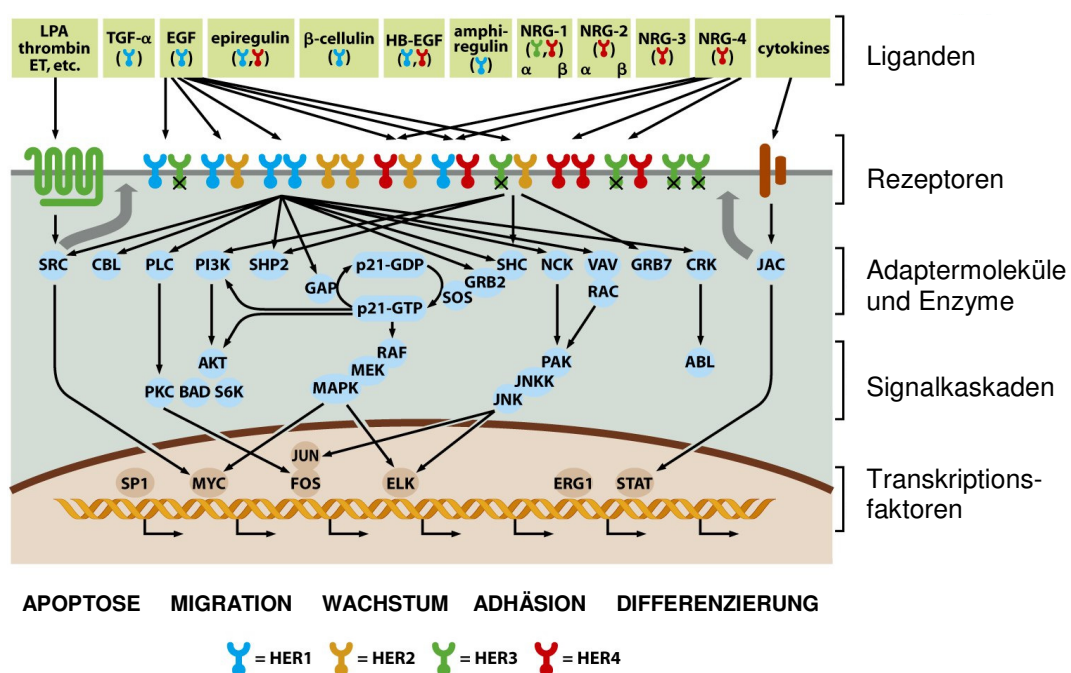
**Tabelle 2:** Strukturelle Charakteristika und Ligandeneigenschaften der Rezeptoren der ErbB-Familie (nach Sundaresan et al., 1998 und Heiss P, 2000)

Rezeptor	HER1	HER2	HER3	HER4
Genlokus	7p11	17q12	12q13	2q33-34
Molekulargewicht in kD	170	185	180	180
Homologie der Aminosäuresequenz der Kinasedomäne bzgl. HER1	-	82%	59%	79%
Ligandenspezifität				
- EGF - TGF $\alpha$ - Amphiregulin	<b>Gruppe 1</b>	x	-	-
- Betacellulin - Hb EGF - Epiregulin				
- NRG 3	<b>Gruppe 3</b>	-	-	x
- NRG 1 - NRG 2	<b>Gruppe 4</b>	-	x	x

EGF = Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor); TGF $\alpha$  = Transforming Growth Factor  $\alpha$  (Transformierender Wachstumsfaktor  $\alpha$ ); Hb EGF = Heparin-binding EGF-like Growth Factor (Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor); NRG = Neuregulin

Die Bildung von Dimeren erhöht nicht nur die Diversität physiologischer Antworten in der Zelle, sondern beeinflusst auch wesentlich die Intensität der Signalübertragung [Lemmon et al., 1994]. Ferner haben biochemische Analysen ergeben, dass die Heterodimerbildung die Ligandenaffinität erhöht [Sliwkowski et al., 1994].

Bindung eines Liganden führt nach Rezeptor-Dimerisierung und Phosphorylierung der Tyrosinreste, die wiederum als Bindungsstelle für Effektorproteine fungieren, schließlich über Aktivierung verschiedener Signalwege zu komplexen physiologischen Antworten in der Zelle (vertikale Signaltransduktion) [Yarden et al., 2001, Klapper et al., 2000].



**Abbildung 9:** Netzwerk der ErbB-Signalgebung. Rezeptoren und ihre Liganden, verantwortlich für den Input, bilden die erste Ebene. Verschiedene intrazelluläre Effektormoleküle (Enzyme, sekundäre Botenstoffe und Transkriptionsfaktoren) bilden die zweite Ebene. Die dritte Ebene, die den Output des Signalgeschehens repräsentiert, umfasst die physiologischen Antworten der Zelle (aus Weinberg, 2007).

Es gibt eine Reihe von Effektormolekülen, die in Zusammenhang mit dem ErbB-Signalling stehen. Im Mittelpunkt steht hierbei unter anderem eine Klasse von intrazellulären Protein-Serin/Threonin-Kinasen, die sogenannten MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases). Die MAPKs, auch genannt ERKs (Extracellular Signal-Regulated Kinases), wirken über die Ras-Raf-MEK-MAPK-Kaskade auf die intrazelluläre Signalgebung ein. Die MAPKs ERK1 und ERK2 phosphorylieren und aktivieren anschließend weitere Substrate. Zum Beispiel kommt es zur Aktivierung von Ets-Transkriptionsfaktoren im Zellkern, die nachfolgend für die

Transkription/Expression von Cyclin D1, p21<sup>WAF</sup> sowie weiteren wachstumsregulierenden Proteinen verantwortlich sind [Weinberg, 2007]. Zur ERK/MAPK-Subfamilie gehören auch die JunNH<sub>2</sub>-terminal-Kinasen/Stress-Activated Protein Kinases (JNKs/SAPKs) und die p38-Kinasen [Cobb et al., 1995; Kyriakis, 1999]. Ferner kommt der PLC- $\gamma$  (Phospholipase C- $\gamma$ ) als weiteres Schlüsselmolekül der ErbB-Signalgebung eine große Bedeutung zu. Deren EGFR-vermittelte Aktivierung führt zur Aktivierung der Proteinkinase C sowie zur IP<sub>3</sub>-vermittelten Kalzium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern [O-charoenrat et al., 2002(2); Klapper et al., 2000]. Ein weiterer Signalweg mit Präferenz zu HER3 und HER4 geht über PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und die Serin/Threonin-Kinase Akt/Proteinkinase B (PKB) [Cantley, 2002; Chan et al., 1999; Vivanco et al., 2002]. Die Signalwege münden jeweils in der Aktivierung für sie spezifischer Transkriptionsfaktoren oder der Hemmung/Aktivierung anderer wichtiger Proteine. Endergebnis der Signaltransduktion ist eine Vielzahl zellulärer Antworten, die Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Proliferation betreffen [Yarden, 2001(1)]. **Abbildung 9** gibt einen Überblick über das komplexe Muster der ErbB-Signalgebung.

### **1.2.3. Organdifferenzielle und onkologische Bedeutung**

Der EGF-Rezeptor ist eine entwicklungsgeschichtlich sehr alte Struktur, dessen Signaltransduktion im Laufe der Evolution einer hohen Konservierung unterlegen ist. Man geht davon aus, dass sich dabei das EGFR-Signaltransduktionsmodell ausgehend von einem singulären Rezeptor hin zu einem komplexen System aus multiplen Wachstumsfaktoren und mehreren strukturhomologen Rezeptoren, wie sie bei Säugern vorkommen, entwickelt hat [Yarden, 2001(1)]. Rezeptoren der EGFR-Familie und ihre Liganden spielen eine große Rolle bei der Gewebeentwicklung epithelialer Organe [Miettinen et al., 1995; Sibilio et al., 1995]. Über die oben beschriebenen Signalwege regulieren sie Zellproliferation, Zellwachstum, Zellüberleben, Adhäsion, Migration und Differenzierung und koordinieren so die physiologischen Prozesse der Morphogenese [Yarden, 2001(1)].

Deregulation dieses Signalnetzwerks hingegen wird als entscheidender Faktor bei der Genese und Progression einiger maligner solider Tumoren gesehen. Dazu gehören z. B. Neoplasien von Gehirn, Lunge, Brust, Ovarien, Pankreas, Prostata und Darm [Hynes et al., 1994; Solomon et al., 1995]. Mutationen oder Rezeptorüberexpression können zu ligandenunabhängiger Dauerstimulation führen und somit eine Deregulation der Signalgebung hervorrufen. Der Rezeptor-Überexpression können beispielsweise Genamplifikation oder Fehlregulationen auf RNA-Ebene zu Grunde liegen [Weinberg, 2007].

#### **1.2.4. Bedeutung der ErbB-Rezeptoren für HNSCC**

Aberrationen im ErbB-System mit ihren Auswirkungen auf verschiedene Signalwege und deren Schlüsselmoleküle sind wohl auch in HNSCC für den Verlust der Wachstumsregulation sowie möglicherweise für Motilität, Angiogenese, Invasion und Metastasenbildung von wesentlicher Bedeutung [O-charoenrat et al., 1999; O-charoenrat et al., 2000(1); O-Charoenrat et al. 2000(2); O-charoenrat et al., 2002(1); O-Charoenrat et al., 2002(2); Rogers et al., 2005].

Der am umfassendsten untersuchte Rezeptor der ErbB-Familie bei HNSCC ist der EGF-Rezeptor. Überexpression des Rezeptors soll in bis zu 90 % der HNSCC auftreten, häufig ohne bestehende Genamplifikation [Kalyankrishna et al., 2006; O-charoenrat et al., 2002(2)]. In vielen Studien wurde die Korrelation zwischen EGFR-Überexpression und klinisch-pathologischen Parametern untersucht. Hohe Expressionsraten sollen mit Invasion, Lymphknotenmetastasen und fortgeschrittenen histopathologischen Stadien assoziiert sein.

Auch erhöhte HER2-Onkoprotein-Levels wurden in HNSCC beschrieben. Jedoch scheint alleinige HER2-Überexpression nicht immer mit prognostischen Parametern zu korrelieren. Die Bedeutung der HER3- und HER4-Expression für HNSCC ist wohl größtenteils noch unklar. In einigen Fällen soll eine Korrelation zwischen Koexpression von HER2, HER3 und HER4 mit der Progression der Erkrankung bestehen [O-charoenrat et al., 2002]. Eine Studie hat ergeben, dass die Expression aller vier ErbB-Rezeptoren mit verkürztem Überleben assoziiert sein soll und dass der prognostische Wert noch ansteigt, wenn man HER2, HER3 und EGFR, nicht jedoch HER4, in Kombination betrachtet [Xia et al., 1999]. Gemeinsame Betrachtung der Mitglieder dieser Rezeptorfamilie ist also möglicherweise aufschlussreicher als deren gesonderte Analyse, vor allem in Hinblick auf neue therapeutische Strategien.

### **1.3. ErbB-Rezeptoren und therapeutische Aspekte**

#### **1.3.1. Das Beispiel Mammakarzinom**

Zunehmendes Verständnis der pathophysiologischen Prozesse bei der Krebsentstehung macht man sich natürlich auch mehr und mehr in der Therapie zu Nutze. Neue Erkenntnisse hinsichtlich Fehlregulationen auf molekularer Ebene stimulieren in hohem Maße die Arzneimittelforschung auf dem Gebiet der Krebstherapie, mit dem Ziel, durch an die Pathophysiologie des Tumors angepasste Strategien effektivere und nebenwirkungsärmere Therapiealternativen

zu den klassischen Chemotherapeutika zu entwickeln. So wurden auch die ErbB-Rezeptoren als mögliche Angriffspunkte in der Tumorthherapie erkannt. Bei einigen Tumorentitäten sind solche neueren Therapieformen aus dem klinischen Alltag nicht mehr wegzudenken.

Als Paradebeispiel, bei dem der gezielte therapeutische Angriff von Wachstumsfaktor-Rezeptoren bereits zu großen Erfolgen geführt hat, gilt das Mammakarzinom. Brustkrebs weist in 20 bis 30 % der Fälle Amplifikation und Überexpression des HER2-Rezeptors auf [Pauletti et al., 1996; Pauletti et al., 2000; Press et al., 2005; Burstein et al., 2005]. HER2-positive Karzinome sind im Vergleich zu Tumoren ohne HER2-Amplifikation oder Überexpression mit einer schlechteren Prognose assoziiert [McCann et al., 1991; Slamon et al., 1987; Svetlovska et al., 2007]. Die Entwicklung des monoklonalen Anti-c-erbB2-Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®) gilt als Meilenstein in der Brustkrebstherapie HER2-positiver Tumoren. Bindung des Antikörpers führt zur Internalisierung des HER2-Trastuzumab-Komplexes in die Zelle und zur Down-Regulation der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche [Yarden, 2001(2)]. Dadurch wird die HER2-induzierte Signaltransduktion gehemmt. Das Medikament wird inzwischen weltweit sowohl als Monotherapeutikum (Second- bzw. Third-Line-Therapie) als auch in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Paclitaxel (First-Line-Therapie) erfolgreich eingesetzt [Svetlovska et al., 2007; Yeon et al., 2005].

### **1.3.2. Der EGF-Rezeptor als pharmakologischer Angriffspunkt**

Auch der EGF-Rezeptor als pharmakologischer Angriffspunkt ist in den letzten Jahren zunehmend ins Interesse der Tumorthherapie gerückt. Damit haben sich für die Behandlung einiger weiterer Tumorentitäten neue Therapieoptionen durch zielgerichtete, sogenannte „biologische“ Therapeutika ergeben. Dazu gehören in erster Linie kolorektale Karzinome, HNSCC und NSCLC [Rocha-Lima et al., 2007]. Die fortgeschrittensten Strategien der medikamentösen EGFR-Hemmung bestehen zum einen in der Antikörper-vermittelten Blockade der extrazellulären Liganden-bindenden Domäne und zum anderen in der Inhibition der intrazellulären Tyrosinkinase durch niedermolekulare Substanzen [Baselga et al., 2005; Mendelsohn et al., 2003; Rocha-Lima et al., 2007]. Der in klinischen Studien am besten untersuchte monoklonale Anti-EGFR-Antikörper ist Cetuximab (IMC-C225, Erbitux®), ein chimäres Human-Murinderivat des murinen MAb 225, der in den USA im Jahr 2004 als erstes für die Therapie EGFR-exprimierender, metastasierter kolorektaler Karzinome (mCRC) zugelassen wurde [Wong, 2005]. Anders als beim HER2-überexprimierenden Mammakarzinom konnte jedoch ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Rezeptorexpressionsgrad und dem Ansprechen auf Therapie mit Cetuximab nicht bestätigt werden [Cunningham et al., 2004; Lenz et al.,



2006; Saltz et al., 2004]. Es konnte sogar ein erfolgreiches Ansprechen auf Cetuximab bei Patienten mit EGFR-negativen Tumoren beobachtet werden [Lenz et al., 2006; Chung et al., 2005]. Auf diese Erkenntnisse stützt sich die Tatsache, dass das EGFR-Expressionsprofil als alleiniger Selektionsparameter für eine Cetuximab-Therapie zunehmend mit einem kritischen Auge betrachtet wird [Rocha-Lima et al., 2007].

Im Jahr 2006 folgte schließlich die FDA-Zulassung von Cetuximab für die Behandlung von HNSCC, basierend auf Studien, die ein verbessertes Outcome unter Cetuximab in Kombination mit Radiotherapie und eine Reduktion der Tumorgröße unter Cetuximab allein belegen [Oncology Announcements, 2006; Bonner et al., 2006]. Indikationen für den Einsatz des Medikaments sind zum einen lokal weit fortgeschrittene, nicht resektable Tumoren, wo Cetuximab mit Strahlentherapie kombiniert wird. Ferner wird es als Monotherapie bei rezidivierenden oder metastasierten Karzinomen, die auf Platin-Chemotherapie nicht angesprochen haben, eingesetzt, und zwar jeweils unabhängig vom EGF-Rezeptorprofil [Oncology Announcements, 2006]. Klinische Erfolge sind unbestritten, und die Entwicklung weiterer EGFR-gerichteter Pharmaka zum Einsatz in Hals-Kopf-Tumoren ist Gegenstand intensiver Forschung. Während sich Matuzumab und MDX-447 aus der Gruppe der monoklonalen Antikörper noch in Phase I/II klinischer Studien befinden, werden verschiedene niedermolekulare Tyrosinkinase-Inhibitoren in Phase II/III untersucht. Dazu gehören zum Beispiel Gefitinib und Erlotinib, bereits zugelassen für die Therapie des NSCLC, und Lapatinib [Rocha-Lima et al., 2007]. Wie schon in Studien zum mCRC beobachtet, fehlt auch hier die Korrelation zwischen Rezeptor-Überexpression und Therapiesensitivität. So haben HNSCC mit unterschiedlichen Expressionsniveaus ähnlich gut auf Cetuximab angesprochen [Mendelsohn et al., 2003].

Es bleibt also weiterhin unklar, inwiefern der Expressionsgrad des Rezeptors allein tatsächlich entscheidend ist, um von einer gegen ihn gerichteten Therapie zu profitieren. Daher wird es in zukünftigen Studien vor allem darauf ankommen, sich nicht nur auf das Expressionsniveau des EGFR alleine zu konzentrieren, sondern auch andere Faktoren mit einzubeziehen. Dies schließt eine Analyse des Expressionsprofils der verschiedenen EGFR-Liganden sowie der zahlreichen möglicherweise fehlregulierten intrazellulären Signalmoleküle der ErbB-Signaltransduktion ein. Ferner gilt der Koexpression der anderen Rezeptoren der ErbB-Familie besonderes Interesse. Möglicherweise spielen bestimmte Koexpressions- und Koamplifikationsmuster auch in der Therapie mehr als bisher angenommen eine Rolle.

#### **1.4. Fragestellung**

In dieser Arbeit sollten an einem Kollektiv von insgesamt 242 HNSCC verschiedener Lokalisationen (Mundhöhle, Larynx, Oro- und Hypopharynx) alle vier Rezeptortypen der ErbB-Familie sowohl auf Protein-Ebene (Immunhistochemie) als auch auf DNA-Ebene (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) untersucht werden.

Retrospektiv sollte der prognostische Wert des Genstatus und des Expressionsprofils der Rezeptoren HER1-4 in Zusammenschau mit klinisch-pathologischen Parametern ermittelt werden.

Die Daten wurden in Bezug zu bekannten klinischen Prognosemarkern (TNM-Stadium, R-Status), Gesamtüberleben und pathologischen Charakteristika wie Malignitätsgrad und Proliferationsaktivität gesetzt. Letztere wurde durch immunhistochemische Bestimmung der Ki-67-Expression bestimmt, dessen signifikante prognostische Rolle als Proliferationsmarker bei HNSCC belegt ist [Smilek et al., 2006].

Aufbauend auf bisherige Studien, die den prognostischen Wert von DNA-Gehalt und DNA-Ploidie bei HNSCC und deren Vorläuferläsionen belegen [Hass et al., 2008; Rubio Bueno et al., 1998], sollte anhand von Untersuchungen der jeweiligen Zentromere der Chromosomen, auf denen die vier ErbB-Rezeptoren kodiert sind, auch das Auftreten und die prognostische Bedeutung chromosomaler Instabilität evaluiert werden.

Dabei sollten die oralen Plattenepithelkarzinome getrennt von den Karzinomen der übrigen Lokalisationen betrachtet werden. Die immunhistochemischen und zytogenetischen Auffälligkeiten dieser beiden Kollektive wurden im Anschluss vergleichend dargestellt und auf Unterschiede untersucht.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Patientenkollektiv und Tumorgewebeproben

Für die vorliegende retrospektive Studie wurden durch das Institut für Pathologie des Universitätsspitals Basel, Schweiz, sogenannte TMA-Schnitte mit Tumorstanzen von insgesamt 242 HNSCC-Patienten zur Verfügung gestellt. Diese Patienten waren zwischen 1988 und 2003 am Universitätsspital Basel in Behandlung.

Das Gesamtkollektiv umfasste 208 männliche und 34 weibliche Patienten. Die Karzinome waren auf die verschiedenen Lokalisationen folgendermaßen verteilt: 84 Oropharynxkarzinome (35 %), 44 Hypopharynxkarzinome (18 %), 91 Larynxkarzinome (38 %) und 23 Mundhöhlenkarzinome (9 %).

Das Kollektiv der 23 Mundhöhlenkarzinome wurde im Studienverlauf gesondert von den Tumoren der restlichen Lokalisationen analysiert. Nachfolgend wird deshalb die Subgruppe der Mundhöhlenkarzinome als OSCC-Kollektiv und die Subgruppe der übrigen Karzinome ausschließlich der Mundhöhlenkarzinome als HNSCC-Kollektiv bezeichnet. Eine Übersicht über die klinisch-pathologischen Parameter der beiden Kollektive (Alter, Geschlecht, T-Stadium, N-Stadium, M-Stadium, Tumorstadium, R-Stadium und Grading) unter Berücksichtigung der jeweiligen Tumorlokalisationen ist in **Tabelle 3** zusammengestellt. Die TNM-Klassifikationen der einzelnen Tumorlokalisationen sowie die Stadiengruppierung nach WHO sind im Anhang aufgeführt.

Das Patientenkollektiv der HNSCC-Gruppe, insgesamt 219 Personen umfassend, beinhaltete 189 männliche und 30 weibliche Patienten im Alter von 38 bis 87 Jahren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, entsprechend einem Durchschnittsalter von 60,05 Jahren. Der Anteil der verschiedenen Karzinomlokalisationen betrug hierbei 42% für Larynx (n = 91), 38% für Oropharynx (n = 84) und 20% für Hypopharynx (n = 44). Die mittlere Beobachtungszeit lag bei 58,5 Monaten (Intervall von 1 bis 226 Monaten). Bei 111 Patienten (50,7 %) traten Tumorpersistenz oder ein Rezidiv auf und 146 (66,7 %) verstarben.

Unter den 23 Patienten des OSCC-Kollektivs waren 19 Männer und 4 Frauen. Das Alter zum Zeitpunkt der Primärdiagnose lag zwischen 37 und 87 Jahren mit einem Durchschnittswert von 60,96 Jahren. Die mittlere Beobachtungszeit im OSCC-Kollektiv lag bei 61,04 Monaten (Intervall von 0 bis 189 Monaten). Bei 11 Patienten (47,8 %) kam es zu Tumorpersistenz oder einem Rezidiv und 14 (60,9 %) verstarben.

**Tabelle 3:** Klinisch-pathologische Parameter der 242 untersuchten HNSCC-Fälle unter Berücksichtigung der verschiedenen Tumorlokalisationen

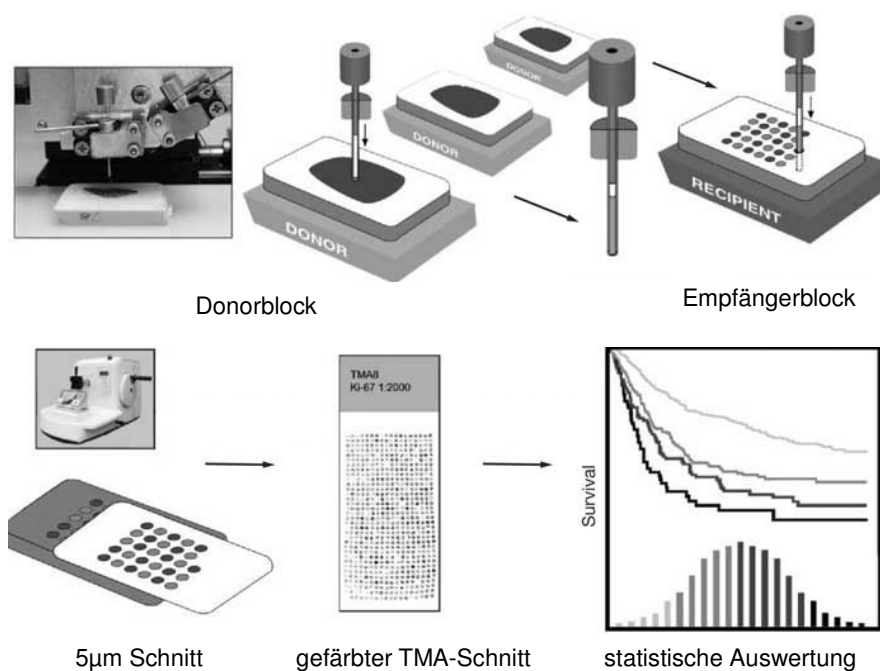
	<b>HNSCC-Kollektiv</b>			<b>OSCC-Kollektiv</b>	<b>Gesamt</b>
	<b>OP</b> n=84	<b>HP</b> n=44	<b>L</b> n=91	<b>OC</b> n=23	n=242 (219+23)
<b>Geschlecht</b>					
männlich	70	38	81	19	<b>208</b> (189+19)
weiblich	14	6	10	4	<b>34</b> (30+4)
<b>Alter</b>					
<75 Jahre	78	41	83	17	<b>219</b> (202+17)
≥75 Jahre	6	3	8	6	<b>23</b> (17+6)
<b>T-Stadium</b>					
T1-2	49	14	53	17	<b>133</b> (116+17)
T3-4	35	30	38	6	<b>109</b> (103+6)
<b>N-Stadium</b>					
N0	23	13	70	12	<b>118</b> (106+12)
N1-2	61	31	21	11	<b>124</b> (113+11)
<b>M-Stadium</b>					
M0	83	44	91	22	<b>240</b> (218+22)
M1	1	0	0	1	<b>2</b> (1+1)
<b>Tumorstadium</b>					
I-II	18	7	50	11	<b>86</b> (74+11)
III-IV	66	37	41	12	<b>156</b> (144+12)
<b>R-Stadium</b>					
R0	56	28	84	22	<b>190</b> (168+22)
R1-2	28	16	7	1	<b>52</b> (51+1)
<b>Grading</b>					
G1-2	50	23	67	20	<b>160</b> (140+20)
G3	34	21	24	3	<b>82</b> (79+3)

HNSCC = Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches); OSCC = Oral Squamous Cell Carcinoma (orale Plattenepithelkarzinome); OP = Oropharynx; HP = Hypopharynx; L = Larynx; OC = Oral Cavity (Mundhöhle)

## 2.2. Tissue Microarray (TMA)-Technik

Die Technik beruht darauf, einen Paraffinblock mit multiplen Gewebeproben von zahlreichen Patienten („Empfänger-Block“) herzustellen. Hierzu müssen zunächst aus repräsentativen Gewebsbezirken der einzelnen konventionellen Paraffinblöcke („Donor-Blöcke“) mithilfe einer Hohlzylinder Gewebezylinder herausgestanzt werden. Anschließend erfolgt unter Doku-

mentation der Anordnung die Einbettung der 0,6 mm durchmessenden Gewebezylinder in den gemeinsamen Empfänger-Paraffinblock, den sogenannten TMA-Block. Von diesem können nun mit einem Mikrotom dünne TMA-Schnitte von 5  $\mu\text{m}$  angefertigt werden. Auf jedem dieser Schnitte befinden sich kleine Stanzen aller im TMA-Block enthaltenen Gewebeproben in gleicher Anordnung wie im TMA-Block. Die einzelnen Schritte der TMA-Technik zeigt **Abbildung 10**. Schließlich können die Schnitte mit verschiedenen Färbemethoden behandelt werden. Die Technik eignet sich insbesondere für immunhistochemische Färbungen sowie für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Die TMA-Technik erlaubt also die gleichzeitige und damit auch für jede Stanze unter gleichen Bedingungen stattfindende Färbung und Beurteilung einer großen Anzahl von Tumorproben verschiedener Patienten. Neben dem Vorteil der experimentellen Uniformität bietet die Technik somit auch einen enorm verringerten Zeitaufwand im Vergleich zur konventionellen Schnitt-Herstellung.



**Abbildung 10:** Herstellung von TMA-Schnitten.

Für die Studie stellte das Universitätsspital Basel jeweils zehn TMA-Schnitte der Lokalisationen Mundhöhle, Pharynx (Oro- und Hypopharynx gemeinsam auf einem Array) und Larynx auf Objektträgern (SuperFrost<sup>TM</sup>Plus; Menzel GmbH, Braunschweig) zur Verfügung. Davon wurde jeweils einer als Referenz HE-gefärbt. An jeweils fünf Schnitten wurden immunhisto-

chemische Färbungen und an den restlichen vier Schnitten FISH-Färbungen durchgeführt. Immunhistochemisch wurde auf je einem Schnitt der verschiedenen Tumorlokalisationen der HER1-Rezeptor und auf weiteren drei Schnitten die anderen Rezeptoren aus der Gruppe der EGFR-Familie (HER2-Rezeptor, HER3-Rezeptor und HER4-Rezeptor) angefärbt. Ein weiterer Schnitt wurde für die immunhistochemische Färbung von Ki-67 verwendet (bereits von Mitarbeitern des Universitätsspitals Basel durchgeführt). Bei den FISH-Färbungen wurden jeweils die Genloci der vier HER-Rezeptoren und das jeweilige Zentromer angefärbt.

## **2.3. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

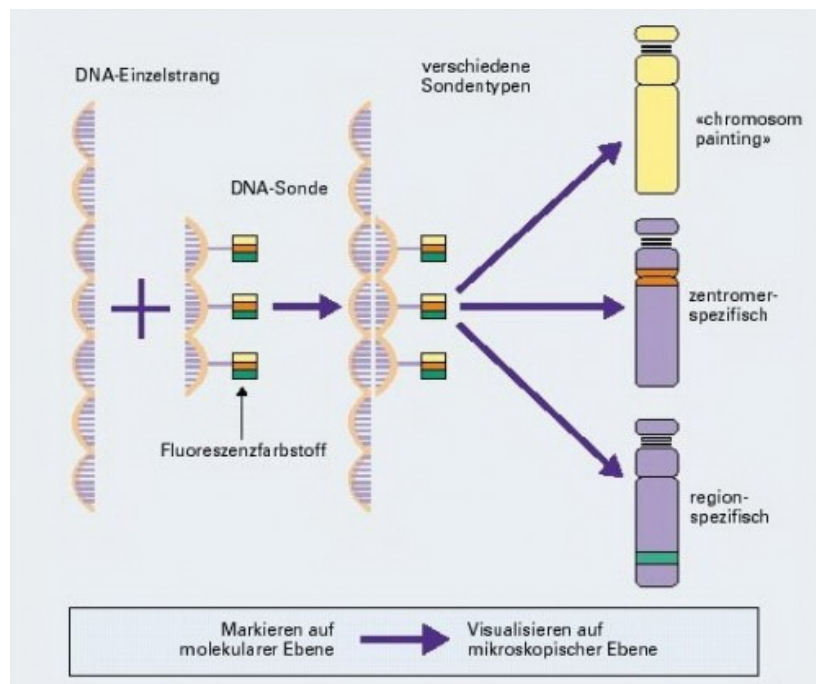
### **2.3.1. Prinzip der FISH**

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist ein weltweit angewandtes diagnostisches Verfahren zur Darstellung definierter Chromosomen und Chromosomenabschnitte. Die Methode basiert auf der Fähigkeit zweier einzelsträngiger Nukleinsäuren mit komplementärer Basensequenz, sich zu einem Doppelstrang zusammenzulagern. Durch Erhitzen der Gewebeschnitte erfolgt eine Denaturierung der Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA, so dass einzelsträngige DNA entsteht (DNA-Schmelzvorgang). Nach Zugabe von speziellen Sonden, die sich zu denjenigen DNA-Abschnitten, die sie detektieren sollen (zum Beispiel Zentromerregionen einzelner Chromosomen oder spezielle Genloci), komplementär verhalten, entsteht durch Basenpaarung eine doppelsträngige Hybrid-DNA. Je nach verwendeter Sonde kann die FISH also zur Detektion einzelner Gene, ausgedehnteren chromosomalen Regionen oder ganzen Chromosomen eingesetzt werden.

Bei den Sonden handelt es sich um Oligonukleotide aus modifizierten Desoxynukleotidtriphosphaten, die fluorochrome Moleküle kovalent an Seitengruppen gebunden haben. Fluoreszierende Moleküle zeichnen sich durch die physiko-chemische Eigenschaft aus, das Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren (Exzitation) und Licht mit einer spezifisch längeren Wellenlänge wieder abzugeben (Emission). Bei der anschließenden mikroskopischen Betrachtung werden die Objekte mit UV-Licht angeregt. Filter mit speziellen Wellenlängen ermöglichen es, sich nur begrenzte Wellenbereiche anzusehen und damit spezifische Signale zu erkennen.

Heute gilt die FISH als eine sehr aussagekräftige Methode zur quantitativen Analyse genetischer Veränderungen in den verschiedensten Zellen, die zwei entscheidende Vorteile bietet:

Zum einen können Chromosomen und Chromosomenabschnitte *in situ*, d. h. mit Bezug zur Morphologie des (Tumor-)zellkerns sichtbar gemacht werden, und zum anderen ist durch die Anwendbarkeit der Methode an Interphasekernen keine Kultivierung der Zellen erforderlich. Das Prinzip der FISH ist in **Abbildung 11** dargestellt.



**Abbildung 11:** Prinzip der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung.

### 2.3.2. Materialien und Geräte

- Objektträger (SuperFrost<sup>TM</sup> Plus; Menzel GmbH, Braunschweig)
- Deckgläser 24 x 24 mm (Engelbrecht, Edermünde)
- Glasküvetten (Dako Diagnostika, Hamburg)
- Pipette und Pipettenspitzen (Gilson, Middleton, Wisconsin, USA)
- Fixogumm (Marabu, Tamm)
- Entellan (Merck, Darmstadt)
- Brutschrank B6060 (Heraeus Sepatech, Osterode)
- Heizplatte (Störk, Stuttgart)
- Wasserbad (Memmert, Schwabach)
- Wasserfilteranlage MILLIPORE (Millipore, Eschborn)

### 2.3.3. Reagenzien und Lösungen

- Aceton
- Eisessig (Essigsäure)
- Ethanol (100%, 80%, 70%)
- HCl (0,01 M)
- Methanol
- Millipore- gefiltertes Wasser
- NaCl
- NaOH
- Pepsin (Sigma-Aldrich)
- Trinatriumcitratdihydrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ )
- Xylol
- DAPI (4,6-Diamin-2-Phenylindoldihydrochlorid) zur Zellkern-Gegenfärbung (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Igepal/NP40 (Serva, Heidelberg)
- Carnoy:  
3 Teile Methanol plus 1 Teil Eisessig
- Pepsin (0,1%):  
50 mg Pepsin/50 mL 0,01 M HCl
- Natriumcitrat-Lösung (0,01 N):  
0,490 g  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  /500 mL Millipore-Wasser  
pH-Werteinstellung auf 6,0 mit HCl
- 20 x SSC [Standard Saline Citrate]-Lösung:  
1,75,32 g NaCl  
88,24 g  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$   
ad 1 L Millipore-Wasser  
pH-Werteinstellung auf 5,3 mit konzentrierter HCl
- 4 x SSC-Lösung (+ NP40 0,3%):  
200 mL 20 x SSC-Lösung mit pH 5,3  
800 mL Millipore-Wasser  
pH-Werteinstellung auf 7,0 bis 7,5 mit 1 N NaOH
- 2 x SSC-Lösung:  
100 mL 20 x SSC mit pH 5,3



900 mL Millipore-Wasser

pH-Werteinstellung auf 7,0 bis 7,5 mit 1 N NaOH

▪ 1 x SSC- Lösung:

50 mL 20 x SSC mit pH 5,3

950 mL Millipore-Wasser

pH-Werteinstellung auf 7,0 bis 7,5 mit 1 N NaOH

#### **2.3.4. DNA-Sonden**

Es wurden direkt-markierte DNA-Sonden für EGFR, HER2, HER3 und HER4 (ZytoVision GmbH, Bremerhaven) verwendet. Über die Sonden wurden sowohl die Genregionen der jeweiligen Rezeptoren als auch die Zentromere der entsprechenden Chromosomen (Chromosom 7 für HER1, Chromosom 17 für HER2, Chromosom 12 für HER3, Chromosom 2 für HER4) identifiziert, was bei der Signalauswertung eine Differenzierung zwischen Genamplifikation und Polysomie ermöglichte.

#### **2.3.5. FISH-Färbeprotokoll**

Die FISH wird an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt: die Schritte von der Entparaffinierung bis zur Hybridisierung erfolgen am ersten Tag, die Schritte DAPI-Färbung und Konservierung am darauf folgenden Tag.

##### Entparaffinierung und Nachfixierung:

- OT für 1 h bei RT in Xylol
- OT für 20 min bei RT in Carnoy
- OT für 20 min bei -20°C in Aceton
- OT für 20 min bei -20°C in Methanol
- OT je 2-3 min bei RT in absteigender Alkoholreihe (100%, 80%, 70%) waschen
- OT 2-3 min bei RT in Millipore-Wasser waschen

##### Denaturierung:

- OT für 40 min in 0,01 N Natriumcitrat (95°C-Wasserbad)
- OT für 10 min in Pepsin 0,1% (37°C-Wasserbad)
- OT 1 min bei RT mit 2 x SSC waschen
- OT 1 min bei RT in Millipore-Wasser waschen

- OT je 1 min bei RT in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 100%) waschen
- OT trocknen

#### Hybridisierung:

- Sonde auf OT geben (3  $\mu$ L)
- Deckglas auf Gewebe legen
- Deckglas mit Fixogumm luftdicht abschließen
- OT für 5 min auf Heizplatte (73°C)
- OT in feuchte Kammer legen
- OT über Nacht im Brutschrank inkubieren (37°C)

#### DAPI-Färbung und Konservierung:

- Deckglas entfernen
- OT 10 min im 50°C-Wasserbad in 4 x SSC (+ NP40 0,3%) waschen
- OT 10 min im 50°C-Wasserbad in 2 x SSC waschen
- OT 10 min im 50°C-Wasserbad in 1 x SSC waschen
- OT für 1 min bei RT in Millipore-Wasser
- OT trocknen lassen
- DAPI zur Färbung der Zellkerne auf Spot geben, eindeckeln
- Deckglas fest auf OT drücken
- mit Eukitt umranden
- OT im Dunkeln bei +2 bis +8°C aufbewahren

### **2.3.6. Mikroskopie, FISH-Auszählung und digitale Bilderstellung**

Bei der mikroskopischen Auszählung der FISH-Signale kamen am Axio Imager Z.1 (Zeiss, Göttingen) drei verschiedene Filter zum Einsatz, um einerseits Zellkerngröße und -form (DAPI-Filter) und andererseits die zum jeweiligen Zellkern gehörigen Genlokus- und Zentromer-signale (rote und grüne Fluoreszenz) getrennt voneinander beurteilen zu können:

- DAPI-Filter: Exzitation 365 +/- 20 nm, Emission 450 +/- 25 nm (Zeiss, Göttingen)
- Grüne Fluoreszenz: Exzitation 500 +/- 10 nm, Emission 535 +/- 15 nm (AHF, Tübingen)
- Rote Fluoreszenz: 545 +/- 15 nm, Emission 610 +/- 35 nm (AHF, Tübingen)

Die Bilder zur Ergebnisdokumentation wurden mithilfe einer CCD (Charge-Coupled Device)-Kamera AxioCam MRm (Zeiss, Göttingen) sowie einer Plan-Apochromat-Linse (63 x, 1.4) erstellt. Dabei wurde der zuvor mikroskopisch ausgewählte repräsentative Bezirk unter Generierung sogenannter Z-Stapel mit definierter Schichtdicke schichtweise abfotografiert, um den Verlust von in verschiedenen Ebenen liegenden FISH-Signalen zu vermeiden. Die digitale Bearbeitung der erstellten Bilder inklusive Farb- und Kontrastoptimierung sowie Projizierung der verschiedenen Schichten auf ein zusammengesetztes Bild erfolgte mit der AxioVision 4.5 Software (Zeiss, Göttingen).

### **2.3.7. Ergebnisevaluation und Auswertungskriterien**

Es wurden jeweils die FISH-Signale von möglichst 50 Zellkernen pro Tumorstanze gezählt. Jede Stanze wurde meanderförmig nach geeigneten Zellkernen abgesucht. Es wurden nur Zellkerne, die sich nicht überlappten und die in der DAPI-Färbung intakt aussahen, berücksichtigt. Große Zellkerne wurden bevorzugt untersucht. Deren Signale wurden Zellkern für Zellkern dokumentiert, z. B. [2-2] für 2 Zentromersignale und 2 Gensignale. Dafür wurden vorgefertigte Auswertungsvorlagen verwendet (**Abbildung 12**). Signale wurden als gesplittet und damit als eines gewertet, wenn sie sehr nahe beieinander lagen und damit nicht deutlich als zwei getrennte Signale zu interpretieren waren. Klar als solche erkennbare Lymphozyten und Zellkerne ohne Signale wurden nicht gewertet. Für die Auszählung wurden die oben angegebenen Filter verwendet. Jede zehnte Stanze wurde von einem unabhängigen Beobachter kontrolliert. Entsprechend des Signalmusters wurde differenziert zwischen normaler Disomie, geringer Polysomie/Trisomie, hoher Polysomie und Genamplifikation. Hinsichtlich des gemeinsamen Auftretens von Polysomie auf verschiedenen Chromosomen wurde der Begriff der chromosomalen Instabilität definiert. Die Einteilung erfolgte in Anlehnung an die bisherige Literatur [Chung et al., 2006] unter Vornahme geringfügiger Modifikationen folgendermaßen:

- **Disomie**  $\leq$  zwei Zentromer-Signale in  $\geq 50$  % der Zellen
- **Geringe Polysomie/Trisomie**  $\geq$  drei Zentromer-Signale in  $\geq 50$  % der Zellen, ausgeschlossen Fälle mit hoher Polysomie und Genamplifikation

- **Hohe Polysomie**  $\geq$  vier Zentromer-Signale in  $\geq 50$  % der Zellen, ausgeschlossen Fälle mit Genamplifikation
- **Genamplifikation** Ratio Gen-Signale/Zentromer-Signale  $\geq 2$
- **Chromosomale Instabilität** Geringe oder hohe Polysomie in  $\geq$  drei der vier untersuchten Chromosomen (2, 7, 12 und 17)

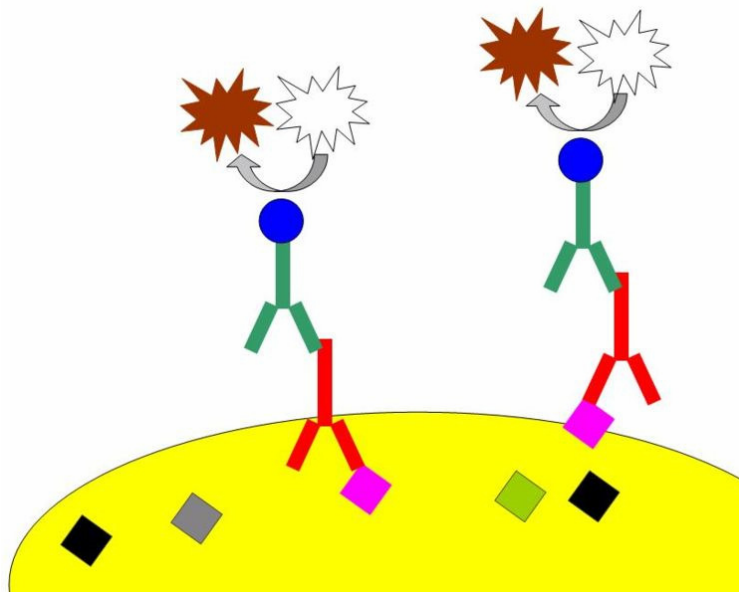
		ZENTROMERE (Z)								
G E N E (G)		1	2	3	4	5	6	7	8+	G gesamt
	1									
	2									5x2
	3									
	4									1x4
	5									4x5
	6									5x6
	7									5x7
	8+									8x8
	Z gesamt	1x1	16x2	11x3						Ratio (G/Z) 163/66=2,47

**Abbildung 12:** FISH-Auswertungsvorlage. Beispiel für eine mögliche Signalkonstellation einer amplifizierten Tumorstanze (Ratio  $\geq 2$ ).

## 2.4. Immunhistochemie (IHC)

### 2.4.1. Prinzip der IHC

Immunhistochemische Färbungen basieren auf der Eigenschaft von Antikörpern, spezifisch und mit hoher Affinität an ihr passendes Antigen zu binden. Prinzipiell unterscheidet man die direkte Methode von der indirekten Methode. Bei der direkten Methode ist der Antigen-spezifische Antikörper selbst chemisch an Peroxidase gekoppelt und ein nachfolgend zugefügtes Substrat färbt den Immunkomplex. Bei der indirekten (zweistufigen) Methode bindet ein unkonjugierter Primärantikörper das Antigen. Um den Immunkomplex zu lokalisieren, wird ein Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper hinzugefügt, welcher an die nicht-bindende Seite des Primärantikörpers bindet und nach Zugabe eines Substrates die Reaktion sichtbar macht (**Abbildung 13**). Letztere, auch im Rahmen dieser Arbeit angewandte Methode erlaubt eine Signalverstärkung, da mehrere sekundäre Antikörper an einen primären Antikörper binden können.



**Abbildung 13:** Prinzip der Immunhistochemie (indirekte Methode).  
Rosa: Antigen. Rot: Primärantikörper. Grün: Sekundärantikörper.

Es gibt eine Reihe von Verfahren, die sich hinsichtlich der Detektionsreagenzien oder der Anzahl der Detektionsschritte unterscheiden. Für den immunhistochemischen Nachweis von EGFR, HER2, HER3 und HER4 kam eine Polymerkonjugat-Methode zum Einsatz. Als Kontrolle für eine spezifische Anfärbung dienten stabil transfizierte Mausfibroblasten (NIH 3T3, Roche Diagnostics, Penzberg).

### **2.4.2. Immunhistochemische Färbung nach der Polymerkonjugatmethode EnVision™**

Diese Methode basiert auf dem Einsatz eines sowohl enzym- als auch antikörpermarkierten Polymerkonjugats, dessen „Rückgrat“ von einem inerten Dextranmolekül (Polysaccharid) gebildet wird. Dieses Dextranpolymer, das durchschnittlich 10 Moleküle Sekundärantikörper und 70 Enzymmoleküle (Horseradish Peroxidase; HRP) enthält, folgt der Applikation des Primärantikörpers. Als Chromogen wird DAB (3,3'-Diaminobenzidin) verwendet.

### **2.4.3. Materialien und Geräte**

- Objektträger (SuperFrost™Plus; Menzel GmbH, Braunschweig)
- Deckgläser (Engelbrecht, Edermünde)
- Entellan (Merck, Darmstadt)
- Wasserbad (Memmert, Schwabach)
- Wasserfilteranlage MILLIPORE (Millipore, Eschborn)

### **2.4.4. Reagenzien und Lösungen**

- Aqua dest.
- Ethanol (100%, 80%, 70%)
- Hämatoxylin (Merck, Darmstadt)
- Millipore-gefiltertes Wasser
- Peroxidase-Blockierung (im jeweiligen Kit enthalten)
- Proteinase K (im EGFR-Kit enthalten)
- Sekundärantikörper-HRP (im jeweiligen Kit enthalten)
- Xylol
- Citratpuffer:

Lösung 1: 29,41 g Natriumcitrat in 1 L Aqua dest. gelöst

Lösung 2: 21,01 g Zitronensäure in 1 L Aqua dest. gelöst

Puffermischung (pH=7,3): 1 mL Lösung 1 mit 49 mL Lösung 2 in 450 mL Aqua dest.

- DAB (3,3'-Diaminobenzidin)-Lösung:

1 mL Waschpuffer (1:10) + 1 Tropfen DAB (im jeweiligen Kit enthalten)

- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Lösung):

8,00g NaCl

1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,20 g KCl

0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Ad 1,00 L Millipore-Wasser

- Waschpuffer (im jeweiligen Kit enthalten): 1:10 verdünnt mit Aqua dest.

#### **2.4.5. IHC-Färbeprotokolle**

Die nacheinander ablaufenden Schritte der immunhistochemischen Färbung sind jeweils:

1. Entparaffinierung
2. Demaskierung
3. Inkubation der Antikörper und Färbung
4. Konservierung

Innerhalb dieser Schritte weichen die Protokolle für die einzelnen Färbungen je nach Herstellerangaben zum Teil voneinander ab. Das HER3- und das HER4-Protokoll sind bis auf die Demaskierung identisch und sind im Folgenden gemeinsam aufgeführt. **Tabelle 4** gibt eine Zusammenfassung der Antikörper-Eigenschaften sowie der wichtigsten Arbeitsschritte der einzelnen Färbeprotokolle (Protokolle nach Herstellerangaben).

#### **EGFR-Protokoll:**

##### Entparaffinierung:

- OT bei RT trocknen (über Nacht)
- 2 x 5 min Xylol
- Absteigende Alkoholreihe (je 2 min 100%, 80%, 70% Ethanol)
- Aqua dest.

##### Demaskierung:

- 3 Tropfen Proteinase K (5 min bei RT)
- Aqua dest.

##### Inkubation der Antikörper und Färbung:

- Peroxidase-Blockierung (5 min bei RT)
- Waschpuffer (5 min bei RT)
- EGFR pharmDX Mouse Anti-Human EGFR Protein (über Nacht, 4°C)

- Waschpuffer (5 min)
- Labelled Polymer, HRP (30 min bei RT)
- Waschpuffer (5 min)
- DAB-Lösung (10 min bei RT)
- Aqua dest. (kurz)

#### Konservierung:

- Hämatoxylin (1 min bei RT)
- Waschen mit Leitungswasser
- Eindeckeln mit Entellan

#### **HER2-Protokoll:**

##### Entparaffinierung:

- Paraffin bei 72°C abschmelzen lassen (30 min)
- 2 x 5 min Xylol
- Absteigende Alkoholreihe (je 2 min 100%, 80%, 70% Ethanol)
- Aqua dest.

##### Demaskierung:

- 10 mM Citratpuffer, pH 7,3 (30 min im 95°C-Wasserbad)
- Abkühlen lassen (20 min bei RT)
- Aqua dest.

##### Inkubation der Antikörper und Färbung:

- Peroxidase-Blockierung (2 min bei RT)
- Waschpuffer (5 min bei RT)
- Primärer Antikörper HER2 1:400 (über Nacht, 4°C)
- Waschpuffer (5 min bei RT)
- Labelled Polymer, HRP (30 min bei RT)
- Waschpuffer (5 min bei RT)
- DAB-Lösung (10 min bei RT)
- Aqua dest. (kurz)



Konservierung:

- Hämatoxylin (1 min bei RT)
- Waschen mit Leitungswasser
- Eindeckeln mit Entellan

**HER3- und HER4-Protokoll:**Entparaffinierung:

- Paraffin bei 72°C abschmelzen lassen (30 min)
- 2 x 5 min Xylol
- Absteigende Alkoholreihe (je 2 min 100%, 80%, 70% Ethanol)
- Millipore-Wasser

Demaskierung:

- HER3: 10 mM Citratpuffer, pH 7,3 (30 min im 95°C-Wasserbad); HER4: 10mM Natriumcitrat, pH 6.0 (30 min im 95°C-Wasserbad)
- Abkühlen lassen (20 min bei RT)
- Aqua dest.

Inkubation der Antikörper und Färbung:

- Peroxidase-Blockierung (3 min bei RT)
- Waschpuffer (5 min bei RT)
- Primärer Antikörper (über Nacht, 4°C)
- Waschpuffer (5 min)
- Sekundärantikörper-HRP (30 min bei RT)
- Waschpuffer (5 min bei RT)
- DAB-Lösung (10 min bei RT)
- Millipore (2 min bei RT)

Konservierung:

- Hämatoxylin (2 min bei RT)
- Leitungswasser (5 min)
- Millipore (1 min)
- Aufsteigende Alkoholreihe (je 2 min 70%, 80%, 100% Ethanol)

- 2 x 5 min Xylol
- Eindeckeln mit Entellan

**Tabelle 4:** Charakteristika der immunhistochemischen Färbungen

	<b>HER1</b>	<b>HER2</b>	<b>HER3</b>	<b>HER4</b>	<b>Ki-67</b>
<b>Antikörper</b>	mAb (Maus)	pAb (Kaninchen)	mAb (Maus)	mAb (Kaninchen)	mAb (Maus)
<b>Firma</b>	Dako	Dako	NanoTools	Cell Signaling	Dako
<b>Klon</b>	2-18C9	-	5A12	83B10	MIB-1
<b>Konzentration Primärantikörper</b>	EGFR pharmDX	HercepTest (2.5 µg/ml)	5 µg/ml Kul- turüberstand	0.7 µg/ml	1.6 µg/ml
<b>Färbemuster</b>	Membran	Membran	Zytoplasma und Membran	Zytoplasma und Membran	Zellkern
<b>Epitop- Demaskierung</b>	Proteinase K	Hitze induziert, 10mM Citrat- puffer, pH 6.0	Hitze induziert, 10mM Citrat- puffer, pH 7.3	Hitze induziert, 10mM Natri- umcitrat, pH 6.0	Hitze induziert, 10mM Citrat- puffer, pH 7.2
<b>Blockierung</b>	Endogene Peroxidase- Blockierung	Endogene Peroxidase- Blockierung	Endogene Peroxidase- Blockierung	Endogene Peroxidase- Blockierung	Endogene Peroxidase- Blockierung
<b>Primärer Antikörper</b>	Über Nacht, 4°C	Über Nacht, 4°C	Über Nacht, 4°C	Über Nacht, 4°C	30 min, RT
<b>Detekti- ons- system</b>	EnVision™ Dual Link System (Dako); DAB + chro- mogenes Sub- strat	EnVision™ Dual Link System (Dako); DAB + chro- mogenes Sub- strat	EnVision™ Dual Link System (Dako); DAB + chro- mogenes Sub- strat	EnVision™ Dual Link System (Dako); DAB + chro- mogenes Sub- strat	iVIEW™ DAB Detection Kit (Ventana)

mAb = monoclonal Antibody (monoklonaler Antikörper); pAb = polyclonal Antibody (polyklonaler Antikörper)

#### **2.4.6. Ergebnisevaluation und Auswertungskriterien**

Die Bestimmung der Expression von HER1-4 erfolgte nach einer semiquantitativen Methode unter Anlehnung an eine zuvor publizierte Studie [Cappuzzo et al., 2005]. Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen für HER1-4 wurden für jede Stanze die Intensität der membranären Färbung sowie der Prozentanteil des angefärbten Tumorgewebes einer Stanze bestimmt. Die Intensität wurde mit Werten von 0 bis 3 (0 für keine Färbung, 1 für

schwache Intensität, 2 für mittelstarke Intensität, 3 für sehr starke Intensität) angegeben. Aus Intensitätswert und Prozentwert wurde anschließend für jede Tumorstanze das Produkt berechnet mit möglichen Werten zwischen 0 und maximal 300 Punkten. Dieser sogenannte Immunhistochemie-Score wurde im Anschluss bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse verwendet.

$$\text{IHC-Score} = \% (\text{positive Zellen}) \times \text{Intensität der Färbung (0-1-2-3)}$$

Ein Score von 180 Punkten von den möglichen 300 Punkten (60%) wurde als Grenze zwischen normaler Expression (< 180 Punkte; negativ) und Rezeptorüberexpression ( $\geq$  180 Punkte; positiv) festgelegt. Ein Score von mindestens 270 Punkten (90%) wurde als sehr starke Rezeptorüberexpression gewertet.

Als Kriterium für Ki-67-Positivität wurde eine nukleäre Färbung von mindestens 70% der Zellkerne festgelegt.

## 2.5. Statistische Analyse

Die bekannten klinisch-pathologischen sowie alle neu ermittelten immunhistochemischen und zytogenetischen Daten wurden mit dem Statistikprogramm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) für Windows, Version 12.0 (SPSS, Erkrath) analysiert. Univariate Überlebensanalysen wurden zum einen mit der Kaplan-Meier-Methode, zum anderen anhand einer Cox-Proportional-Hazards-Analyse (Cox-Regression) durchgeführt. Letztere ermöglicht auch eine Analyse nicht-kategorisierter Variablen und die Bestimmung der Hazard Ratio unter Angabe des 95%-Konfidenzintervalls. Mithilfe der Kaplan-Meier-Methode wurden Überlebenskurven erstellt. Das Gesamtüberleben bezeichnet dabei die Zeit von der Diagnose des Tumors bis zum Tod jedweder Ursache oder bis zu dem Datum, zu dem der Patient zuletzt als lebend verzeichnet war. Patienten, die sich dem Follow-up entzogen, wurden als zensierte Fälle behandelt, wobei der Zeitpunkt, zu dem sie zuletzt als lebend verzeichnet waren, zugrunde gelegt wurde. Unterschiede zwischen den jeweils definierten Gruppen wurden mit dem Log Rank-Test berechnet, wobei ein signifikanter Unterschied bei einem p-Wert < 0,05 vorlag. Mögliche Assoziationen zwischen dichotomisierten immunhistochemischen bzw. zytogenetischen Markern und klinisch-pathologischen Faktoren wurden mit dem Fisher-Exakt-Test untersucht, wobei ein p-Wert < 0,05 als signifikante Assoziation definiert wurde. Für die multi-

variate Analyse kam ein Cox-Regressions-Modell mit schrittweise rückwärts ablaufender Datensелеktion zur Anwendung. Hierbei wird bei jedem Schritt der am wenigsten signifikante Faktor mit  $p > 0,10$  eliminiert und jeder einzelne Faktor neu bewertet. Zur Evaluation der Unabhängigkeit wurde die Korrelation zwischen den als prognostisch bedeutsam vermuteten Faktoren und den bekannten Prognosemarkern mithilfe des Phi-Korrelationskoeffizienten berechnet.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. HNSCC-Kollektiv

##### 3.1.1. Immunhistochemische Färbung von HER1-4

###### 3.1.1.1. Deskriptive Analyse

Jeder der vier Rezeptoren der EGFR-Familie wurde nach etablierten Methoden spezifisch immunhistochemisch angefärbt. Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde durch Kontrollfärbung stabil transfizierter Mausfibroblasten gesichert. Anschließend wurde für jede Tumorstanze unter Berücksichtigung von Färbeintensität und relativen Anteil des gefärbten Gewebes ein Score zwischen 0 und 300 Punkten bestimmt. Als Grenzwert zwischen normaler Expression ( $< 180$  Punkte; negativ) und Überexpression des Rezeptors ( $\geq 180$  Punkte; positiv) wurde ein Prozentwert von 60 % an möglichen Punkten (180 Punkte) festgelegt. Ein Score von mindestens 270 Punkten ( $\geq 90$  % an möglichen Punkten) wurde als sehr starke Überexpression gewertet.

Aus technischen Gründen (teilweises oder komplettes Abschwimmen einiger Tumorstanzen vom Objektträger, kein Tumorgewebe auf der Stanze erfasst) konnten nicht alle 219 Fälle der Studie ausgewertet werden. So konnten bei der HER1-Immunhistochemie 178 Stanzen (81 %) nach den entsprechenden Kriterien beurteilt werden, bei der HER2-, HER3- und HER4-Färbung waren es 167 (76 %), 165 (75 %) bzw. 181 (82 %) gut auswertbare Stanzen. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen sind in **Tabelle 5** aufgeführt.

49,4 % (88 von 178) der Tumoren aus der HNSCC-Gruppe erwiesen sich mit einem Score von mindestens 180 Punkten als positiv für HER1 (HER1-Überexpression). Von diesen 88 Fällen mit HER1-Positivität zeigten 54 Tumoren mit einem Score von 270 Punkten oder mehr eine sehr starke Überexpression des Rezeptors. Dies entspricht einem Anteil von 61,4 % bei den HER1-überexprimierenden Tumoren bzw. von 30,3 % insgesamt. Bei 50,6 % (90 von 178) der Tumoren lag der ermittelte Score unter 180 Punkten, was nach den definierten Kriterien als HER1-Negativität gewertet wurde. Damit zeigte sich im HNSCC-Kollektiv bei knapp der Hälfte der Karzinome mit auswertbarer Färbung eine Überexpression des EGF-Rezeptors. Der HER2-Rezeptor war in 6,6 % (11 von 167) der Fälle überexprimiert ( $\geq 180$  Punkte), während 93,4 % (156 von 167) ein normales Färbeverhalten zeigten ( $< 180$  Punkte). Ein Score von 270 oder mehr wurde für HER2 nur in einem der Fälle erreicht. Vier unterschiedliche Färbemuster von HER2 sind in **Abbildung 14** dargestellt.

Die immunhistochemische Färbung von HER3 und HER4 fiel in allen Fällen negativ aus. Die Score-Werte der HER3- und HER4-Färbung lagen fast ausschließlich bei 0 Punkten, d. h. keiner der untersuchten Tumoren wies annähernd einen Score von 180 Punkten oder mehr und damit eine Rezeptorüberexpression auf.

### **3.1.1.2. Univariate Überlebensanalysen nach Cox-Regression**

Im Rahmen einer univariaten Cox-Proportional-Hazards-Regression wurde die prognostische Bedeutung einer HER1- und HER2-Überexpression ermittelt. Die Ergebnisse bei Dichotomisierung der Daten (Einschluss kategorisierter Variablen) sind in **Tabelle 6** zusammengefasst. HER2-Positivität ( $\geq 180$  Punkte) stellte sich als signifikanter negativer Prognosefaktor heraus ( $p < 0,01$ ; HR = 2,651). Bei Einschluss der HER2-Daten in nicht-dichotomisierter Form ergab sich ebenfalls signifikant ein prognostischer Nachteil für hohe HER2-Expression ( $p = 0,03$ ; HR = 1,004; 95% CI: 1,000-1,007).

Im Gegensatz dazu konnte dem HER1-Status im HNSCC-Kollektiv kein prognostischer Wert zugeschrieben werden. Bei dichotomisiertem Vorgehen unter Trennung der Fälle mit normaler HER1-Expression von denen mit Überexpression ( $< 180$  Punkte vs.  $\geq 180$  Punkte) lag der p-Wert mit 0,45 (HR = 0,871) nicht im signifikanten Bereich. Stellte man die Fälle mit sehr starker HER1-Überexpression den übrigen Fällen gegenüber ( $< 270$  Punkte vs.  $\geq 270$  Punkte), so ergab sich ebenfalls kein signifikanter Einfluss auf das Überleben in der univariaten Cox-Regression ( $p = 0,09$ ; HR = 0,702; 95% CI: 0,467-1,056). Die nicht-kategorisierte Analyse der HER1-Daten erbrachte einen p-Wert von 0,32 (HR = 0,999; 95% CI: 0,998-1,001).

### **3.1.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von HER1-4**

#### **3.1.2.1. Deskriptive Analyse**

Für die zytogenetische Beurteilung der Rezeptoren wurden jeweils die Genregion und das entsprechende Zentromer mit Sonden von verschiedenfarbiger Fluoreszenz hybridisiert. Gemäß der Anzahl der mikroskopisch ausgezählten Zentromer- und Gensignale wurde im Anschluss jede beurteilbare Tumorstanze einer der folgenden, in Anlehnung an die bisherige Literatur definierten Kategorien zugeordnet: Disomie, geringe Polysomie, hohe Polysomie und Genamplifikation.

Aus oben beschriebenen technischen Gründen musste wiederum auf die Auswertung mehrerer Stenzen verzichtet werden, so dass von den insgesamt 219 eingeschlossenen Fällen bei der HER1-FISH 155 Stenzen (71 %) ein gut beurteilbares Hybridisierungsmuster aufwiesen. Bei

den Hybridisierungen von HER2, HER3 und HER4 konnten 171 (78 %), 149 (68 %) bzw. 154 (70 %) Stenzen in die statistischen Analysen einbezogen werden. **Abbildung 14** veranschaulicht mögliche Hybridisierungsmuster nach FISH unter Berücksichtigung von Gen- und Zentromerstatus.

Wie in **Tabelle 5** aufgeführt, wiesen 8 der 155 auswertbaren HER1-Hybridisierungen (5,2 %) eine Genamplifikation des HER1-Rezeptors auf. 16 Fälle (10,3 %) zeigten eine hohe Polysomie und 38 Fälle (24,5 %) eine geringe Polysomie des Chromosoms 7, während 93 Fälle (60 %) ein normales Hybridisierungsmuster aufwiesen und damit der Kategorie Disomie zugeordnet wurden.

**Tabelle 5:** Immunhistochemische Färbung und zytogenetische Analyse von HER1-4 (HNSCC-Kollektiv)

	HER1 [n(%)]	HER2 [n(%)]	HER3 [n(%)]	HER4 [n(%)]
<b>Immunhistochemie</b>				
Gesamt	178	167	165	181
Positiv (Score $\geq 180$ )	88(49,4)	11(6,6)	0(0)	0(0)
davon Score $\geq 270$	54 (61,4)	1 (9,1)	-	-
Negativ (Score $< 180$ )	90(50,6)	156(93,4)	165(100)	181(100)
<b>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung</b>				
Gesamt	155	171	149	154
Disomie	93(60)	130(76)	125(83,9)	103(66,9)
Geringe Polysomie (Trisomie)	38(24,5)	38(22,2)	23(15,4)	47(30,5)
Hohe Polysomie	16(10,3)	3(1,8)	1(0,7)	4(2,6)
Genamplifikation	8(5,2)	0(0)	0(0)	0(0)

Im Gegensatz zu den Ergebnissen für Chromosom 7 ergab die zytogenetische Analyse der Genloci von HER2, HER3 und HER4 und ihrer entsprechenden Zentromere (Zentromer 17 für HER2, Zentromer 12 für HER3, Zentromer 2 für HER4) mit Häufigkeiten zwischen 0,7 und 2,6% nur selten eine hohe Polysomie. Eine Amplifikation dieser drei Rezeptorgene lag in

keinem der Fälle vor. Jedoch zeigte sich in jeweils 22,2 % (38 von 171), 15,4 % (23 von 149) bzw. 30,5 % (47 von 154) eine geringe Polysomie der Chromosomen 17, 12 bzw. 2. Der weit-aus dominierende Anteil zeigte keine zytogenetischen Aberrationen (**Tabelle 5**).

### 3.1.2.2. Univariate Überlebensanalysen nach Cox-Regression

Um den prognostischen Wert der FISH-Ergebnisse zu ermitteln, wurden zwei verschiedene Formen der Daten-Dichotomisierung vorgenommen: einmal wurden nur Tumoren mit disomer Signal-Konstellation als normal (FISH-negativ) und alle anderen Kategorien (geringe und hohe Polysomie, Genamplifikation) als abnorm und damit FISH-positiv gewertet. In einer weiteren statistischen Analyse wurde die Gruppe der disomen und gering polysomen Tumoren (FISH-negativ) den hoch polysomen und amplifizierten Tumoren (FISH-positiv) gegenübergestellt. Wie aus **Tabelle 6** ersichtlich, ergab keine der beiden Rechnungen bei einzelner Betrachtung jedes Rezeptors und des jeweiligen Zentromers eine prognostische Signifikanz hinsichtlich der Zytogenetik im Rahmen der Überlebensanalyse.

Weitere Analysen wurden ergänzt, um gezielt den prognostischen Einfluss der Ratio (definiert als Anzahl der Gensignale pro Anzahl der Zentromersignale in 50 Zellkernen) und des Zentromerindex (definiert als Anzahl der Zentromersignale pro Anzahl der ausgezählten Zellkerne) zu erfassen. Hierzu wurde für jedes der vier Rezeptorgene respektive sein Zentromer eine univariate Cox-Regressions-Analyse unter Einschluss der jeweiligen Daten in nicht-dichotomisierter Form durchgeführt.

Besonderes Interesse galt dem HER1-Gen, wobei sich jedoch weder hinsichtlich der Gen/Zentromer-Ratio ( $p = 0,38$ ; HR = 1,141, 95% CI: 0,850-1,532) noch hinsichtlich des Zentromerindex ( $p = 0,62$ ; HR = 1,050; 95% CI: 0,867-1,271) ein prognostisch signifikantes Ergebnis zeigte.

Auch bei den anderen Rezeptoren respektive ihren Zentromeren ergab sich keine prognostische Bedeutung dieser beiden Parameter. Die erhobenen Daten zeigen, dass zytogenetische Veränderungen auf Chromosom 7 einschließlich Genamplifikation des HER1-Gens relativ häufig beobachtet werden können, wenn auch ohne prognostische Signifikanz.

Weiterhin zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen HER1-Genamplifikation (Ratio  $\geq 2$ ) und HER1-Überexpression (Immunhistochemie-Score  $\geq 180$  Punkte) im Fisher-Exakt-Test ( $p = 0,01$ ). Die dazugehörige Kontingenztafel ist in **Tabelle 7** dargestellt.



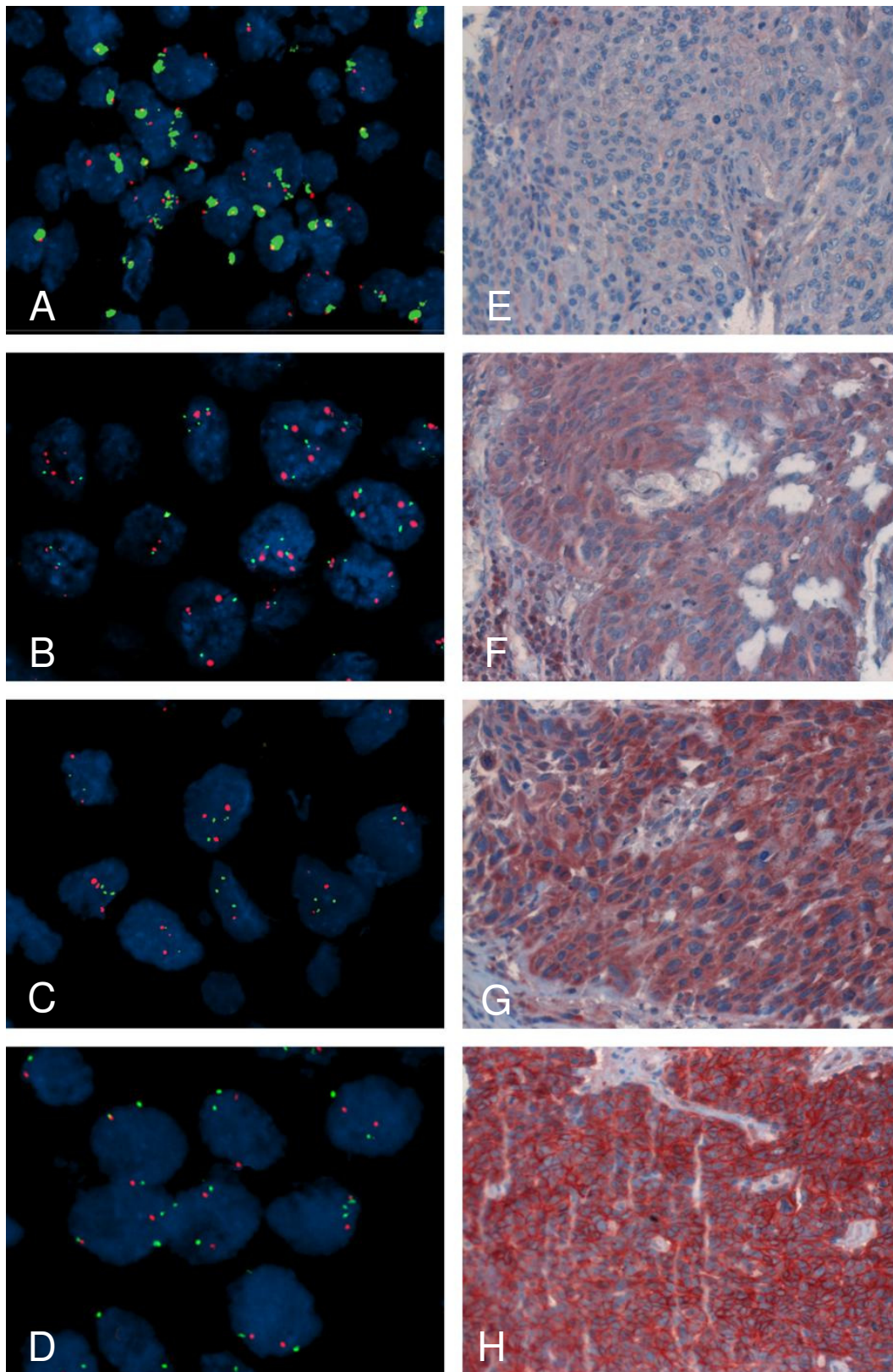
**Tabelle 6:** Cox-Proportional-Hazards-Überlebensanalyse (HNSCC-Kollektiv)

Parameter	Technik	HR	95% CI	p
HER1	IHC (<180 vs. ≥180)	0,871	0,610-1,243	0,45
	FISH*	1,073	0,727-1,582	0,72
	FISH**	1,175	0,689-2,002	0,55
HER2	IHC (<180 vs. ≥180)	2,651	1,372-5,120	<b>&lt;0,01</b>
	FISH*	1,360	0,907-2,038	0,14
	FISH**	0,592	0,146-2,406	0,46
HER3	IHC	-	-	-
	FISH*	1,057	0,627-1,782	0,84
	FISH**	0,049	<0,001-631,096	0,53
HER4	IHC	-	-	-
	FISH*	1,136	0,751-1,718	0,55
	FISH**	1,743	0,549-5,537	0,35

Hazard ratios (HR), Konfidenzintervalle (CI) und p-Werte der untersuchten Parameter bezogen auf das Gesamtüberleben. Alle immunhistochemischen und zytogenetischen Parameter wurden als kategorisierte Variablen verwendet. FISH = Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; IHC = Immunhistochemie; \*Disomie vs. geringe Polysomie/hohe Polysomie /Genamplifikation; \*\*Disomie/geringe Polysomie vs. hohe Polysomie /Genamplifikation

**Tabelle 7:** Kreuztabelle aus den Daten der HER1-Immunhistochemie und HER1-FISH (Ratio) unter Angabe der jeweiligen Fallzahlen (HNSCC-Kollektiv) und des p-Werts nach Fisher-Exakt-Test

<i>p=0,01</i>		HER1/FISH		Gesamt
		Ratio<2	Ratio≥2	
<b>HER1/ IHC</b>	<180 Punkte	72	0	72
	≥180 Punkte	66	7	73
Gesamt		138	7	145



**Abbildung 14:** Links: FISH (x 630) von HER1-4 und der zugehörigen Zentromere (HER1-2: Gen grün, Zentromer rot; HER3-4: Gen rot, Zentromer grün). (A) Genamplifikation von HER1. (B) Hohe Polysomie von HER2. (C) Geringe Polysomie von HER3. (D) Disomie von HER4. Rechts: Immunhistochemische Färbungsmuster von HER2 (x 400): (E) Score 0 = keine Färbung. (F) Score 100 = schwache Färbung. (G) Score 200 = mittelstarke Färbung. (H) Score 300 = starke Färbung

### **3.1.3. Weitere Überlebensanalysen in Zusammenschau mit Assoziations- und Korrelationsuntersuchungen**

#### **3.1.3.1. Univariate Analysen nach Kaplan-Meier**

Im Rahmen einer univariaten Überlebensanalyse der einzelnen Parameter wurden mit der Kaplan-Meier-Methode deren prognostische Bedeutung unter Angabe des p-Werts (Log Rank-Statistik) errechnet und Überlebenskurven erstellt. Dabei wurden zunächst die bekannten klinisch-pathologischen Parameter der 219 Fälle untersucht und wie folgt dichotomisiert: geringe lokale Tumorausdehnung (T1-T2) versus fortgeschrittenes T-Stadium (T3-T4), negativer regionaler Lymphknotenstatus (N0) versus regionale Lymphknotenmetastasen (N1-N2-N3), keine Fernmetastasierung (M0) versus Fernmetastasen (M1), tumorfreier Resektionsrand (R0) versus mikroskopischer oder makroskopischer Tumorrest (R1-R2), hoch- und mittelgradige Tumordifferenzierung (G1-G2) versus niedriger Differenzierungsgrad (G3), jüngeres Patientenalter zum Diagnosezeitpunkt ( $< 75$  Jahre) versus höheres Patientenalter ( $\geq 75$  Jahre). Die Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier stellte lokal fortgeschrittenes Tumorwachstum, positive regionale Lymphknoten und positiven R-Status als signifikante negative Prognosefaktoren ( $p$  jeweils  $< 0,01$ ) heraus und bestätigte damit das Vorliegen eines für Überlebensstudien adäquat zusammengesetzten Tumorkollektivs. Hinsichtlich M-Status (nur ein M1-Fall in der Gruppe;  $p = 0,07$ ), Tumoriging ( $p = 0,12$ ) und Patientenalter ( $p = 0,28$ ) ergab sich kein statistisch signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben.

Im Anschluss wurden mit den neu erfassten Daten aus Immunhistochemie und FISH Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt. Wie bereits im Cox-Proportional-Hazards-Modell gezeigt, erwies sich HER2-Überexpression (Score  $\geq 180$  Punkte) signifikant als prognostisch bedeutsamer Faktor ( $p < 0,01$ ) mit statistisch kürzerem Gesamtüberleben im Vergleich zur normalen Rezeptorexpression. Ebenso war eine hohe Proliferationsaktivität des Tumors, definiert als Ki-67-Expression in  $\geq 70$  % der Zellen, signifikant mit einem negativen Einfluss auf das Überleben assoziiert ( $p = 0,02$ ). Dieses Kriterium erfüllten 49 Fälle (29 %) von insgesamt 169 auswertbaren Ki-67-gefärbten Tumorstanzen. Weiterhin sprechen die Daten für eine prognostische Bedeutung der chromosomalen Instabilität: Die Fälle, die in der FISH-Analyse eine Polysomie von mindestens drei der vier untersuchten Chromosomen in jeweils mehr als 50 % der Tumorzellen zeigten, waren signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ( $p = 0,01$ ). Dies unterstreicht die Bedeutung der zytogenetischen Untersuchung auch bei fehlender statistischer Signifikanz bei einzelner Betrachtung der analysierten Chromosomen. Das Kriterium der chromosomalen Instabilität erfüllten im HNSCC-Kollektiv 21 Fälle. Die

Kaplan-Meier-Überlebenskurven zu den untersuchten bekannten und neuen Parametern sind in den **Abbildungen 15 und 16** dargestellt.

Mithilfe des Fisher-Exakt-Tests wurde bestimmt, inwiefern eine Assoziation zwischen den prognoserelevanten neu ermittelten Daten (HER2-Expression, Ki-67-Expression, chromosomale Instabilität) und den bekannten klinisch-pathologischen Faktoren (T-Stadium, N-Stadium, M-Stadium, R-Stadium, Grading, Patientenalter) besteht (**Tabelle 8**).

**Tabelle 8:** HER2, Ki-67 und chromosomale Instabilität in Beziehung zu klinischen und histologischen Faktoren (p-Werte entsprechend Fisher-Exakt-Test), dargestellt als Kontingenztabellen unter Angabe der jeweiligen Fallzahlen (HNSCC-Kollektiv)

Parameter	HER2			Ki-67			Chromosomale Instabilität		
Methode	Immunhistochemie			Immunhistochemie			Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung		
	pos.	neg.	p-Wert	pos.	neg.	p-Wert	pos.	neg.	p-Wert
<b>Gesamt</b>	<b>11</b>	<b>156</b>		<b>49</b>	<b>120</b>		<b>21</b>	<b>105</b>	
<b>T-Stadium</b>									
T1-2	3	92	0,06	24	67	0,50	12	63	0,81
T3-4	8	64		25	53		9	42	
<b>N-Stadium</b>									
N0	1	77	0,01	18	56	0,31	5	50	0,06
N1-2-3	10	79		31	64		16	55	
<b>M-Stadium</b>									
M0	11	155	1,00	49	119	1,00	21	104	1,00
M1	0	1		0	1		0	1	
<b>R-Stadium</b>									
R0	6	126	0,05	37	94	0,69	15	87	0,23
R1-2	5	30		12	26		6	18	
<b>Grading</b>									
G1-2	5	102	0,21	25	82	0,05	12	69	0,46
G3	6	54		24	38		9	36	
<b>Alter</b>									
<75 Jahre	9	144	0,23	44	111	0,55	19	95	1,00
≥75 Jahre	2	12		5	9		2	10	

pos.= positiv, definiert wie folgt – **HER2**: ≥180 Punkte; **Ki-67**: ≥70% positiv gefärbte Zellen; **chromosomale Instabilität**: ≥3 (von 4) Chromosomen mit ≥3 Zentromeren in ≥50% der Zellen. neg.= negativ, definiert wie folgt – **HER2**: <180 Punkte, **Ki-67**: <70% positiv gefärbte Zellen, **chromosomale Instabilität**: <50% polysome Zellen.

Eine signifikante positive Assoziation ergab sich zwischen hoher HER2-Expression und positivem Lymphknoten-Status ( $p = 0,01$ ). An der Grenze zur Signifikanz lagen die errechneten  $p$ -Werte für die Assoziationen zwischen positivem HER2-Status und fortgeschrittenem T-Stadium ( $p = 0,06$ ), zwischen HER2-Überexpression und positivem R-Stadium ( $p = 0,05$ ), zwischen positiver Ki-67-Expression und niedrigem Tumordifferenzierungsgrad ( $p = 0,05$ ) sowie zwischen chromosomaler Instabilität und positivem N-Stadium ( $p = 0,06$ ). **Tabelle 8** zeigt die Ergebnisse in Form von Kontingenztabellen.

### 3.1.3.2. Multivariate Analyse nach Cox-Regression

In die multivariate Analyse sollten alle bekannten klinisch-pathologischen Parameter (T-Stadium, N-Stadium, M-Stadium, R-Stadium, Tumorgading, Alter) unabhängig von ihrer prognostischen Relevanz sowie diejenigen neu untersuchten Parameter, die sich zuvor in der univariaten Analyse als statistisch signifikante Prognosemarker erwiesen hatten (HER2-Immunhistochemie, Ki-67-Immunhistochemie, chromosomale Instabilität/FISH), einbezogen werden.

Da nur Fälle mit vollständiger Datenverfügbarkeit in eine multivariate Analyse eingeschlossen werden können, reduzierte sich die Patientenzahl auf 113 Fälle, nämlich 50 Oropharynxkarzinome, 28 Hypopharynxkarzinome und 35 Larynxkarzinome. Auf die übrigen 106 Fälle, von denen aus oben beschriebenen technischen Gründen einzelne oder mehrere Daten zu den entsprechenden Parametern fehlten, musste hier verzichtet werden.

Die Art der Kategorisierung der Variablen blieb bei allen Rechnungen unverändert. Für das verkleinerte Patientenkollektiv wurden zunächst alle für die multivariate Analyse ausgewählten Parameter ein weiteres Mal einer univariaten Analyse nach der Kaplan-Meier-Methode (Log Rank-Statistik) unterzogen (**Tabelle 9**). Hierbei bestätigte sich signifikant die Prognoserelevanz der Parameter T-Stadium ( $p = 0,01$ ), Lymphknoten-Status ( $p < 0,01$ ), R-Status ( $p < 0,01$ ), HER2-Expression ( $p < 0,01$ ) und chromosomale Instabilität ( $p = 0,03$ ). Hohe Ki-67-Expression als Ausdruck der Proliferationsaktivität zeigte sich in diesem reduzierten Kollektiv nicht mehr als statistisch signifikanter Prognosefaktor ( $p = 0,23$ ).

Schließlich erfolgte die multivariate Analyse der ausgewählten bekannten und neuen Parameter über Cox-Regression. Mit der Einschluss-Methode erwiesen sich hohes T-Stadium, positiver R-Status, hohe HER2-Expression und chromosomale Instabilität als prognostisch signifikante Parameter, während sich für N-Positivität, M-Status, Grading, Patientenalter und Ki-67-Positivität kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben ergab. In der anschließenden Modelladaption in Form einer schrittweise ablaufenden Datenselektion setzte sich R-

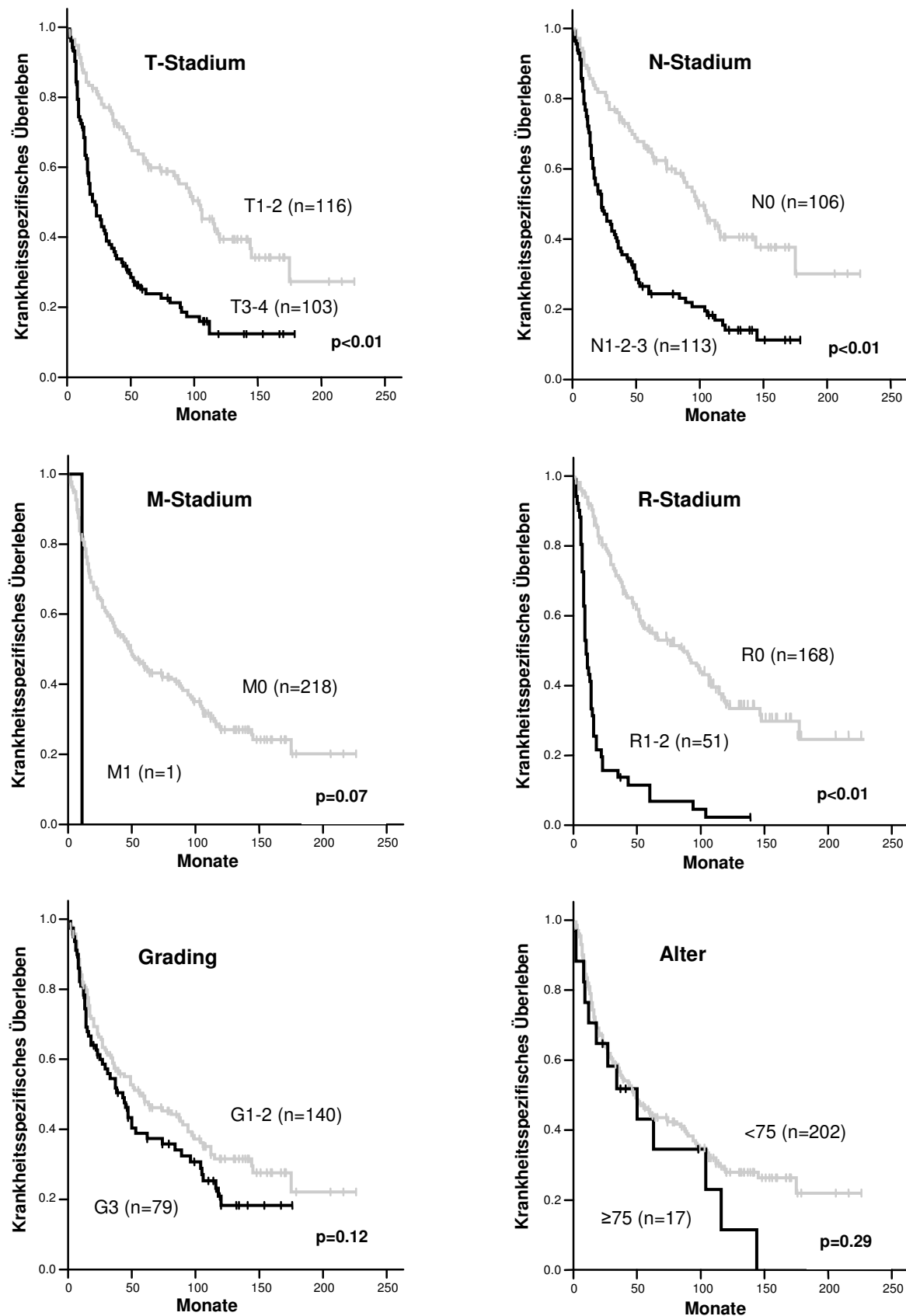
Positivität als der prognostisch bedeutsamste Parameter durch (HR = 7,401), gefolgt von hoher HER2-Expression (HR = 3,405), chromosomaler Instabilität (HR = 1,852) und T-Stadium (HR = 1,035). Der N-Status blieb in der multivariaten Analyse ohne statistische Signifikanz. Ebenso fielen die übrigen eingeschlossenen Parameter nacheinander beim Prozess der Daten-selektion heraus (**Tabelle 9**).

**Tabelle 9:** Univariate Analyse (Kaplan-Meier, Log Rank-Statistik) und multivariate Analyse (Cox-Regression mit schrittweise rückwärts ablaufender Datenselektion): berechnete p-Werte (HNSCC-Kollektiv)

Variable	Kodierung	Univariat (n=113)	Multivariat (n=113)			HR (95% CI)
		Log Rank	Schr. 1	Schr. 2-5	Schr. 6	
<b>T-Stadium</b>	T1-2 (n=66) vs. T3-4 (n=47)	<b>&lt;0,01</b>	<0,01	...	<b>&lt;0,01</b>	1,035 (1,012-1,057)
<b>N-Stadium</b>	N0 (n=47) vs. N1-2-3 (n=66)	<b>&lt;0,01</b>	0,17	...		
<b>M-Stadium</b>	M0 (n=112) vs. M1 (n=1)	0,08	0,32	...		
<b>R-Stadium</b>	R0 (n=91) vs. R1-2 (n=22)	<b>&lt;0,01</b>	<0,01	...	<b>&lt;0,01</b>	7,401 (4,050-13,524)
<b>Grading</b>	G1-2 (n=69) vs. G3 (n=44)	0,12	0,24	...		
<b>Alter</b>	<75 (n=102) vs. ≥75 (n=11)	0,67	0,11	...		
<b>HER2/IHC</b>	<180 (n=106) vs. ≥180 (n=7)	<b>&lt;0,01</b>	0,02	...	<b>&lt;0,01</b>	3,405 (1,511-7,670)
<b>Ki-67/IHC</b>	<70 (n=84) vs. ≥70 (n=29)	0,23	0,11	...		
<b>Chr Inst/ FISH</b>	neg. (n=93) vs. pos. (n=20)	<b>0,03</b>	0,03	...	<b>0,03</b>	1,852 (1,056-3,250)

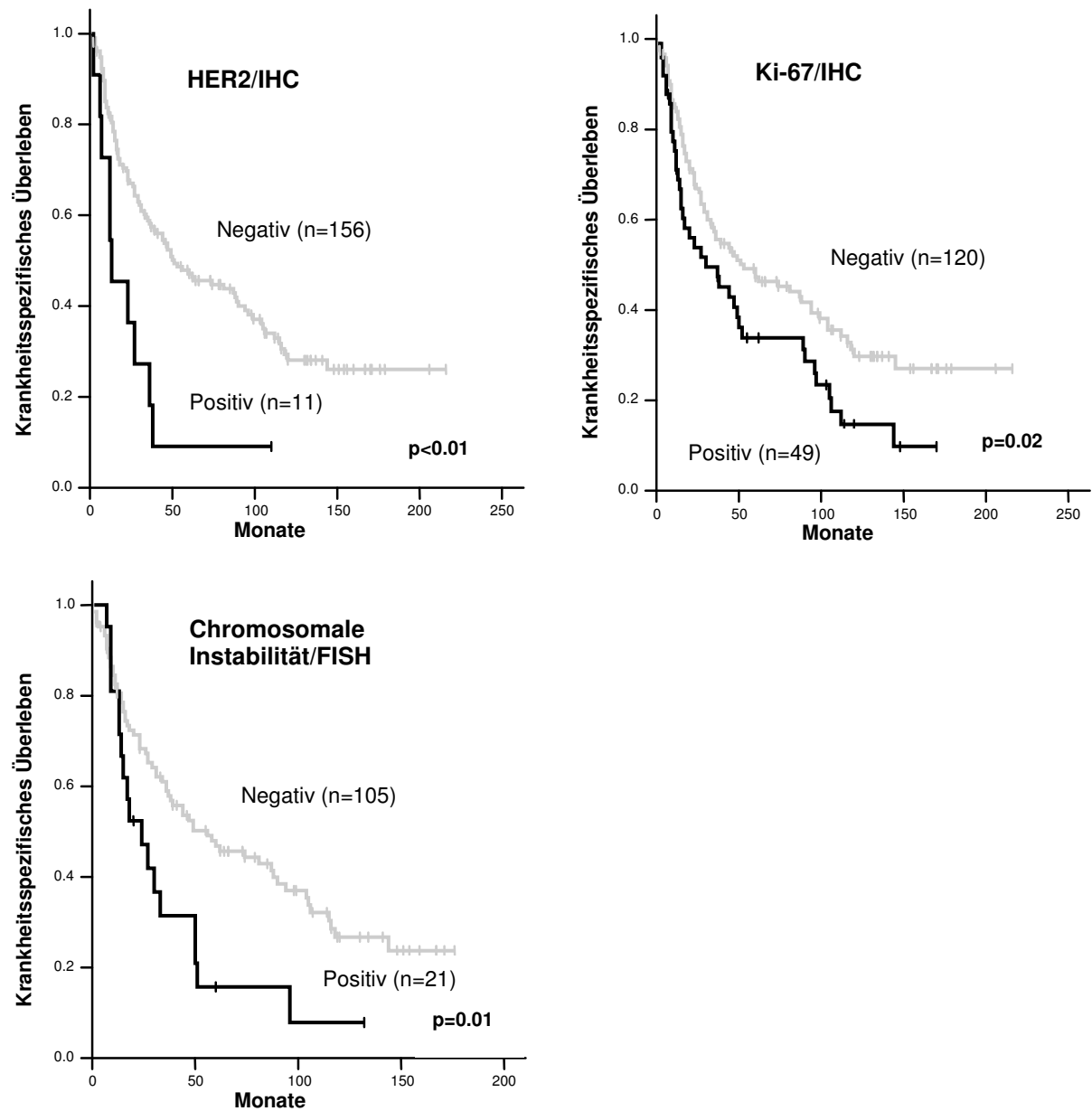
n = Anzahl der Patienten; HR = Hazard Ratio; CI = Konfidenzintervall; IHC = Immunhistochemie; FISH = Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; Chr Inst = chromosomale Instabilität; Schr. = Schritt; pos. = positiv: ≥3 (von 4) Chromosomen mit ≥3 Zentromeren in ≥50% der Zellen; neg. = negativ: <50% aberrante Zellen

Um die Parameter der multivariaten Analyse auf (Un)abhängigkeit zu prüfen, wurden Korrelationsanalysen auf Basis des Phi-Korrelationskoeffizienten ergänzt. Hierbei wurden die Faktoren jeweils paarweise auf Korrelation geprüft. Eine signifikante Korrelation zeigte sich zwischen lokal fortgeschrittenem Tumorwachstum und positivem Lymphknotenbefall ( $\Phi = 0,31$ ,  $p < 0,01$ ), zwischen positivem R-Status und positivem N-Status ( $\Phi = 0,32$ ,  $p < 0,01$ ) sowie zwischen positivem R-Status und Fernmetastasierung ( $\Phi = 0,19$ ,  $p = 0,04$ ).



**Abbildung 15:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven zu T-, N-, M- und R-Stadium, Grading und Patientenalter (HNSCC-Kollektiv).





**Abbildung 16:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven zu HER2-Immunhistochemie, Ki-67-Immunhistochemie und chromosomaler Instabilität/FISH (HNSCC-Kollektiv).

## 3.2. OSCC-Kollektiv

### 3.2.1. Immunhistochemische Färbung von HER1-4

#### 3.2.1.1. Deskriptive Analyse

Analog zum Vorgehen im HNSCC-Kollektiv wurden auch die oralen Plattenepithelkarzinome spezifisch für die Rezeptoren HER1-4 immunhistochemisch angefärbt und nach den bereits beschriebenen Kriterien ausgewertet.

Auch bei den TMA-Schnitten mit den Mundhöhlenkarzinomen kam es zum Verlust von auswertbarem Tumormaterial, jedoch waren auf dem entsprechenden Array die Patienten zumeist mehrfach repräsentiert, so dass es gelang, von allen 23 Fällen alle gewünschten Daten zu erheben. Für die Patienten, zu denen doppelt oder mehrfach Daten vorhanden waren, wurden Mittelwerte gebildet. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen sind in **Tabelle 10** aufgeführt.

Der HER1-Rezeptor war in 7 Fällen (30,4 %) überexprimiert (Score  $\geq 180$  Punkte). Über die Hälfte davon (4 von 7 Fällen) wies mit einem Score von 270 Punkten oder mehr eine sehr starke Überexpression des Rezeptors auf, entsprechend einem Anteil von 57,1 % bei den HER1-Überexprimierten bzw. von 17,4 % insgesamt. Auf 16 (69,6 %) der Tumorstanzen betrug der Immunhistochemie-Score der HER1-Expression unter 180 Punkte.

Dies traf auch auf sämtliche Fälle bei der Färbung der anderen drei Rezeptoren (HER2, HER3, HER4) zu. Bei den oralen Plattenepithelkarzinomen kam also im Gegensatz zum HNSCC-Kollektiv keine HER2-Überexpression vor.

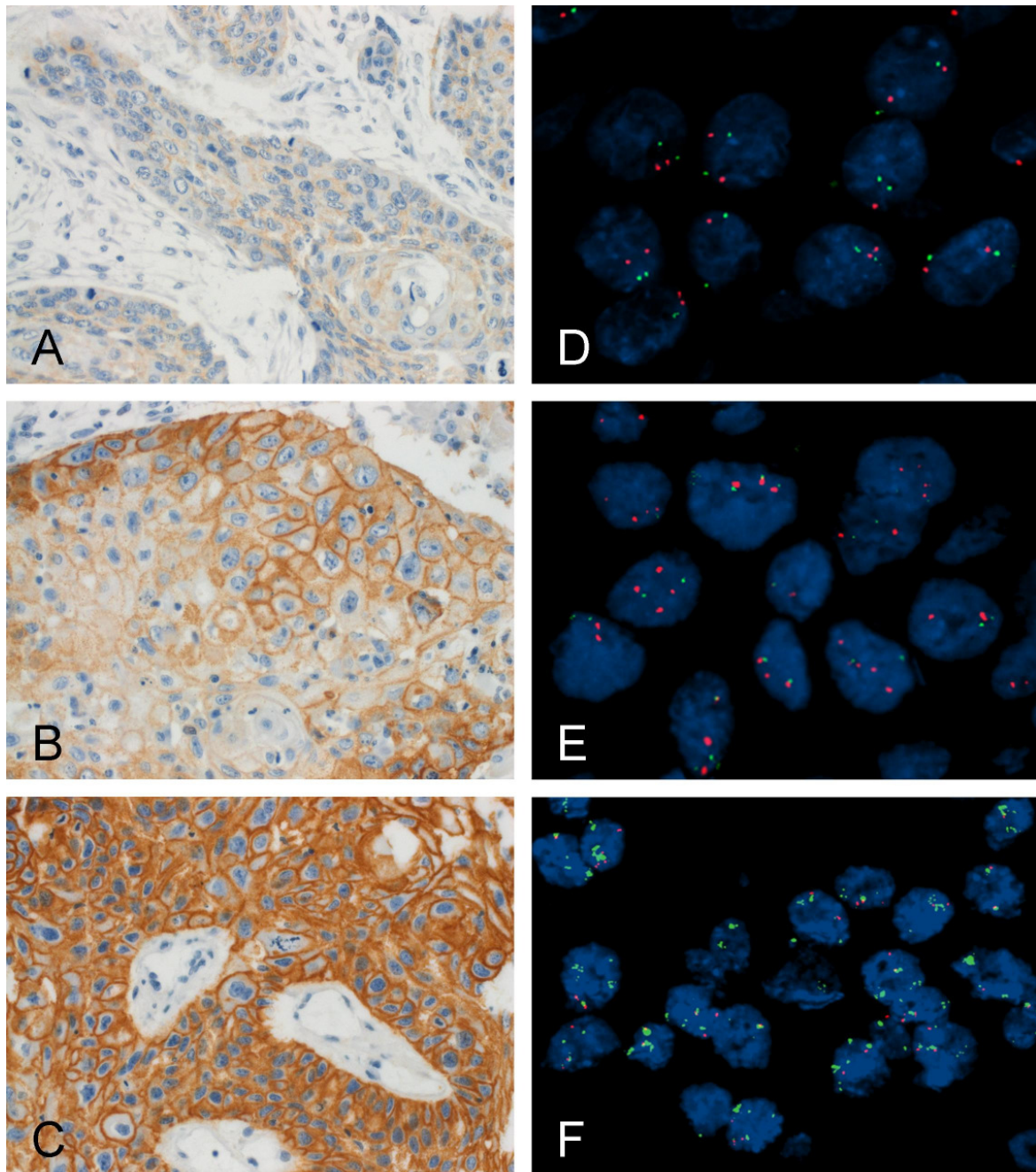
#### 3.2.1.2. Univariate Überlebensanalysen nach Cox-Regression

Anders als bei der HER3- und HER4- Auswertung, wo die Score-Werte fast ausschließlich bei 0 Punkten lagen, fiel bei HER2 aber durchaus eine Variabilität der Score-Werte zwischen 0 und 100 Punkten auf.

Deshalb wurden zur Evaluation einer möglichen prognostischen Bedeutung unterschiedlicher HER2-Expressionslevels die HER2- Immunhistochemie-Daten in nicht-kategorisierter Form in eine univariate Cox-Regression eingeschlossen (**Tabelle 12**). Es ergab sich dabei kein prognostisch relevantes Ergebnis für den HER2-Status ( $p = 0,33$ ;  $HR = 0,179$ ).

Um die prognostische Bedeutung des HER1-Status zu ermitteln, wurde ebenfalls eine Cox-Proportional-Hazards-Überlebensanalyse durchgeführt. Die HER1-Daten wurden auf drei

verschiedene Varianten in die Berechnung eingeschlossen, wobei sich hohe HER1-Expression jeweils signifikant als negativer Prognosemarker herausstellte: Die Kategorisierung „Überexpression ( $\geq 180$  Punkte) versus normale Expression ( $< 180$  Punkte)“ ergab einen p-Wert von 0,04 (HR = 3,167; 95% CI: 1,043-9,614). Auch bei Trennung zwischen den sehr stark überexprimierten Fällen ( $\geq 270$  Punkte) und den restlichen ( $< 270$  Punkte) zeigte sich eine signifikante Assoziation hoher HER1-Expressionsniveaus mit einem kürzerem Gesamtüberleben (p = 0,01; HR = 4,847; 95% CI: 1,371-17,133). Für die folgenden Assoziationsanalysen und die multivariate Analyse wurde deshalb der Grenzwert von 270 Punkten verwendet. Wie in **Tabelle 12** ersichtlich, unterstreicht auch das Ergebnis unter Einschluss der Variable in nicht-kategorisierter Form die prognostische Bedeutung der HER1-Expression (p < 0,01; HR = 1,008). Drei verschiedene Färbemuster der HER1-Immunhistochemie sind in **Abbildung 17** dargestellt.



**Abbildung 17:** Links: Drei verschiedene Färbungsmuster von HER1/IHC (x 400): (A) Score 50 (50x1) = schwache Färbung. (B) Score 150 (50x3) = mittelstarke Färbung. (C) Score 300 (100x3) = starke Färbung/Überexpression. Rechts: FISH (x 630) von HER1 (grün) und des entsprechenden Zentromers (rot). (D) Disomie. (E) geringe Polysomie. (F) Genamplifikation.

### 3.2.2. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von HER1-4

#### 3.2.2.1. Deskriptive Analyse

Wie beim HNSCC-Kollektiv beschrieben, wurden nach durchgeführter Hybridisierung auch bei den Mundhöhlenkarzinomen jeweils Gen- und Zentromerstatus der Rezeptorgene HER1-4 und ihrer korrespondierenden Zentromere bestimmt.

Da von den meisten Patienten mehrere Tumorstanzen verfügbar waren, gelang es mit Ausnahme der HER2-FISH (21 auswertbare Fälle von 23) ebenfalls, ein komplettes Daten-Set zu erheben (**Tabelle 10**).

**Tabelle 10:** Immunhistochemische Färbung und zytogenetische Analyse von HER1-4 (OSCC-Kollektiv)

	HER1 [n(%)]	HER2 [n(%)]	HER3 [n(%)]	HER4 [n(%)]
<b>Immunhistochemie</b>				
Gesamt	23	23	23	23
Positiv (Score $\geq 180$ )	7(30,4)	0(0)	0(0)	0(0)
davon Score $\geq 270$	4(57,1)	-	-	-
Negativ (Score $< 180$ )	16(69,6)	23(100)	23(100)	23(100)
<b>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung</b>				
Gesamt	23	21	23	23
Disomie	15(65,3)	13(61,9)	21(91,3)	12(52,2)
Geringe Polysomie (Trisomie)	3(13)	7(33,3)	2(8,7)	10(43,5)
Hohe Polysomie	3(13)	1(4,8)	0(0)	1(4,3)
Genamplifikation	2 (8,7)	0(0)	0(0)	0(0)

Wie aus **Tabelle 10** hervorgeht, wiesen 2 der 23 Fälle (8,7 %) eine Genamplifikation von HER1 auf. 3 Fälle (13 %) zeigten eine hohe Polysomie von Chromosom 7, weitere 3 Fälle (13

%) eine geringe Polysomie und die restlichen 15 Fälle (65,3 %) eine normale Disomie. Unterschiedliche Hybridisierungsmuster der HER1-FISH sind in **Abbildung 17** veranschaulicht.

Bei der Betrachtung von HER2, HER3 und HER4 und ihrer zugehörigen Zentromere 17,12 und 2 wurde eine hohe Polysomie nur selten beobachtet (4,8 %, 0 % und 4,3 %). Eine Amplifikation dieser Rezeptorgene kam nicht vor. In 33,3 % (7 von 23), 8,7 % (2 von 23) bzw. 43,5 % (10 von 23) der Fälle imponierte in der FISH-Analyse eine geringe Polysomie der Zentromere 17,12 bzw. 2.

### 3.2.2.2. Univariate Überlebensanalysen nach Cox-Regression

Auch die für das OSCC-Kollektiv erfassten FISH-Daten wurden über univariate Cox-Regressions-Analysen auf prognostische Relevanz geprüft.

Ein Einschluss der erfassten zytogenetischen Daten auf die beim HNSCC-Kollektiv beschriebenen zwei unterschiedlich dichotomisierten Varianten ergab für keines der untersuchten Gene bzw. Zentromere einen signifikanten prognostischen Einfluss.

Weiterhin wurden Gen/Zentromer-Ratio und Zentromerindex auf nicht-kategorisierte Weise hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz untersucht (**Tabelle 12**). Hierbei imponierte die Ratio bei der HER1-FISH als signifikanter negativer Prognosemarker. Die übrigen Parameter stellten sich nicht als prognostisch bedeutsam heraus. Die Gegenüberstellung der für HER1 amplifizierten Fälle (Ratio  $\geq 2$ ) und der nicht-amplifizierten Fälle (Ratio  $< 2$ ) ergab wie die nicht-dichotomisierte Untersuchung der HER1-Ratio signifikant einen prognostischen Nachteil für Amplifikation des HER1-Gens ( $p = 0,01$ ).

Über einen Fisher-Exakt-Test wurde ferner eine signifikante Assoziation zwischen sehr starker Proteinüberexpression von HER1 (Score  $\geq 270$  Punkte) und Amplifikation des HER1-Gens festgestellt ( $p = 0,02$ ). **Tabelle 11** zeigt die zugehörige Kontingenztafel.

**Tabelle 11:** Kreuztabelle aus den Daten der HER1-Immunhistochemie und HER1-FISH (Ratio) unter Angabe der jeweiligen Fallzahlen (OSCC-Kollektiv) und des p-Werts nach Fisher-Exakt-Test

<i>p=0,02</i>	HER1/FISH		Gesamt
		Ratio<2	Ratio $\geq 2$
<b>HER1/ IHC</b>	<270 Punkte	19	2
	$\geq 270$ Punkte	0	2
Gesamt		19	4
			23

**Tabelle 12:** Cox-Proportional-Hazards-Überlebensanalyse (OSCC-Kollektiv)

Parameter	Technik	HR	95% CI	p
HER1	IHC	1,008	1,002-1,013	<b>&lt;0,01</b>
	Ratio*	2,124	1,178-3,829	<b>0,01</b>
	Zentromerindex**	1,080	0,648-1,801	0,71
HER2	IHC	1,011	0,989-1,033	0,33
	Ratio*	0,179	<0,001-162,652	0,62
	Zentromerindex **	0,814	0,299-2,216	0,69
HER3	IHC	-	-	-
	Ratio*	17,389	0,153-1974,356	0,24
	Zentromerindex **	2,221	0,586-8,422	0,24
HER4	IHC	-	-	-
	Ratio*	0,063	0,001-6,636	0,25
	Zentromerindex **	2,257	0,886-5,755	0,09

Hazard Ratios (HR), Konfidenzintervalle (CI) und p-Werte der untersuchten Parameter bezogen auf das Gesamtüberleben. Alle immunhistochemischen und zytogenetischen Parameter wurden als nicht-kategorisierte Variablen verwendet. FISH = Fluoreszenz- in-situ-Hybridisierung; IHC = Immunhistochemie; \*definiert als Anzahl der Gene/Anzahl der Zentromere; \*\*definiert als Anzahl der Zentromere/Anzahl der Zellen

### 3.2.3. Weitere Überlebensanalysen in Zusammenschau mit Assoziations- und Korrelationsuntersuchungen

#### 3.2.3.1. Univariate Analysen nach Kaplan-Meier

Zur Darstellung des prognostischen Einflusses der bekannten klinischen und histologischen Parameter wurden auch für das OSCC-Kollektiv Kaplan-Meier-Analysen unter Erstellung von Überlebenskurven durchgeführt und hierfür die Parameter folgendermaßen dichotomisiert: geringe lokale Tumorausdehnung (T1-T2) versus fortgeschrittenes T-Stadium (T3-T4), negativer regionaler Lymphknotenstatus (N0) versus regionale Lymphknotenmetastasen (N1-N2-N3), keine Fernmetastasierung (M0) versus Fernmetastasen (M1), niedriges Tumorstadium (I-II) versus hohes Tumorstadium (III-IV), tumorfreier Resektionsrand (R0) versus mikroskopischer oder makroskopischer Tumorrast (R1-R2), hoher und mäßiger Tumordifferenzie-

rungsgrad (G1-G2) versus niedrige Tumordifferenzierung (G3), jüngeres Patientenalter (< 80 Jahre) versus höheres Patientenalter (> 80 Jahre) zum Zeitpunkt der Tumordiagnose.

Fortgeschrittenes Tumorstadium und hohes Patientenalter stellten sich signifikant als negative Prognosefaktoren heraus ( $p = 0,03$  und  $p = 0,02$ ). Tumordifferenzierungsgrad und R-Status (nur ein Fall R-positiv) zeigten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben (siehe **Tabelle 14**). Ebenso waren N- und M-Status alleine in dem kleinen OSCC-Kollektiv keine statistisch signifikanten Prognosefaktoren; lediglich die gemeinsame Betrachtung mit dem T-Status in Form der Stadiengruppierung zeigte ein signifikantes Ergebnis hinsichtlich krankheitsspezifischem Überleben.

Bei Kaplan-Meier-Analyse der neu ermittelten Immunhistochemie- und FISH-Daten ergab sich, wie bereits in der univariaten Cox-Regression gezeigt, dass Proteinüberexpression (beide Grenzwerte) und Genamplifikation des HER1-Gens signifikant mit einem kürzerem Gesamtüberleben assoziiert sind ( $p = 0,03$  für den Grenzwert 180,  $p < 0,01$  für den Grenzwert 270 und  $p < 0,01$ ). Die Überlebenskurven zu den einzelnen Parametern sind in den **Abbildungen 18 und 19** dargestellt.

Mithilfe des Fisher-Exakt-Tests wurde ermittelt, inwiefern eine Assoziation zwischen den beiden prognoserelevanten neu ermittelten Daten (HER1-Expression und HER1-Genamplifikation) und den bekannten klinisch-pathologischen Faktoren (Tumorstadium, R-Stadium, Grading, Patientenalter) besteht (**Tabelle 13**). Es zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen den untersuchten Parametern.



**Tabelle 13:** Immunhistochemische und zytogenetische Untersuchung von HER1 in Beziehung zu klinischen und histologischen Faktoren (p-Werte entsprechend Fisher-Exakt-Test), dargestellt als Kontingenztabellen unter Angabe der jeweiligen Fallzahlen (OSCC-Kollektiv)

Parameter	HER1					
	Immunhistochemie			Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung		
Methode	pos.	neg.	<i>p-Wert</i>	pos.	neg.	<i>p-Wert</i>
<b>Gesamt</b>	<b>4</b>	<b>19</b>		<b>2</b>	<b>21</b>	
<b>Tumorstadium</b>						
I-II	1	10	<i>0,59</i>	1	10	<i>1,00</i>
III-IV	3	9		1	11	
<b>R-Status</b>						
R0	4	18	<i>1,00</i>	2	20	<i>1,00</i>
R1-2	0	1		0	1	
<b>Grading</b>						
G1-2	4	16	<i>1,00</i>	2	18	<i>1,00</i>
G3	0	3		0	3	
<b>Alter</b>						
<80 Jahre	2	18	<i>0,07</i>	1	19	<i>0,25</i>
≥80 Jahre	2	1		1	2	

pos.= positiv, definiert wie folgt – HER1-Immunhistochemie:  $\geq 270$  Punkte; HER1-FISH: Ratio  $\geq 2$ .  
neg.= negativ, definiert wie folgt – HER1-Immunhistochemie:  $< 270$  Punkte; HER1-FISH: Ratio  $< 2$ .

### 3.2.3.2. Multivariate Analyse nach Cox-Regression

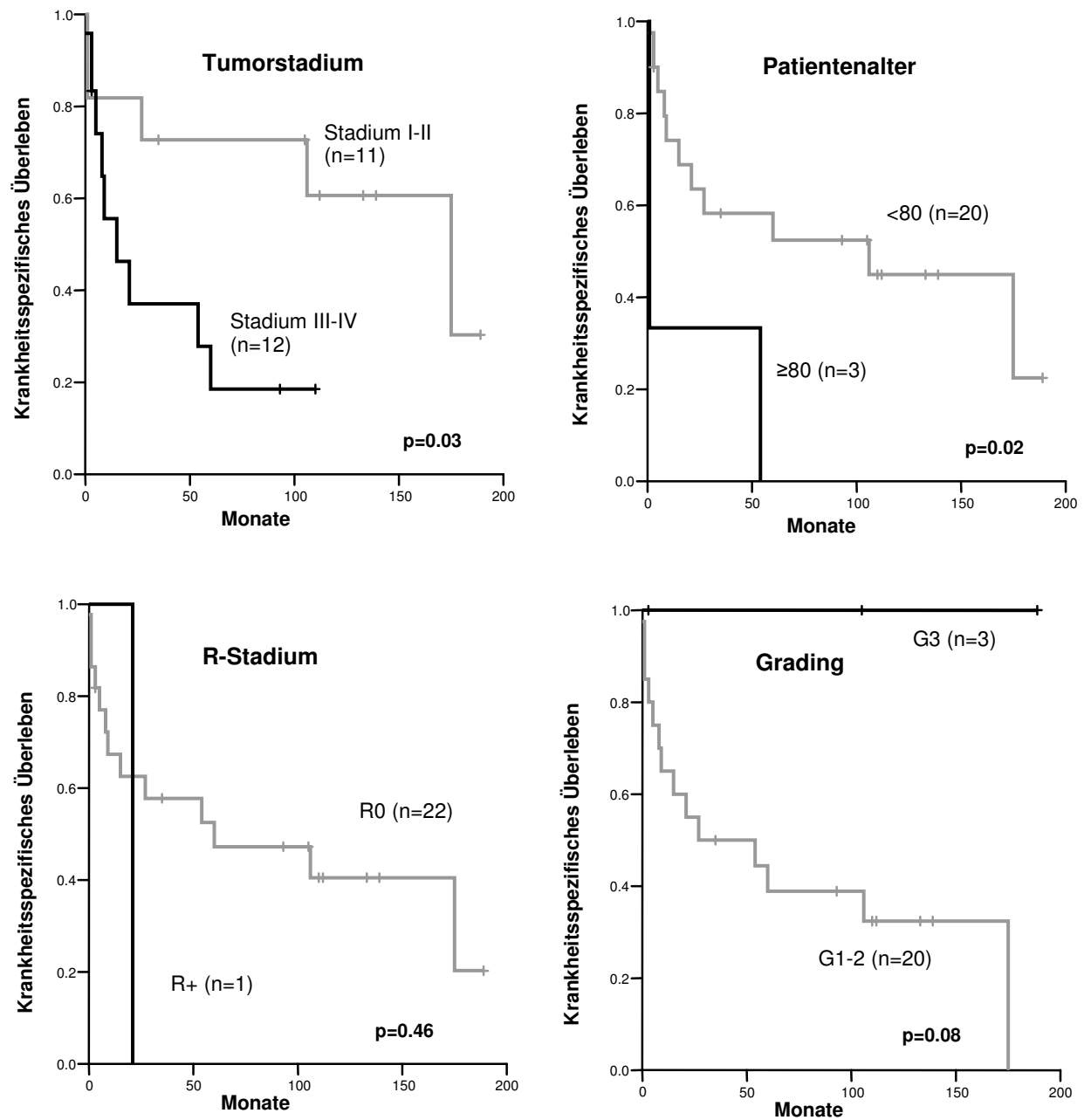
Die univariaten Überlebensanalysen wurden durch eine multivariate Cox-Regression ergänzt, wobei alle in der univariaten Kaplan-Meier-Analyse signifikanten Faktoren (Tumorstadium, Patientenalter, HER1-Immunhistochemie und HER1-FISH) in die Analyse eingeschlossen wurden. Mit der Einschluss-Methode erwies sich lediglich ein fortgeschrittenes Tumorstadium als prognostisch signifikanter Parameter, während sich für HER1-Überexpression, HER1-Genamplifikation und Patientenalter kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben ergab. In der anschließenden Modelladaption in Form einer schrittweise ablaufenden Datenselektion setzte sich allerdings die HER1-Ratio als prognostisch bedeutsamster und einziger signifikanter Parameter durch (HR = 10,809), gefolgt vom Tumorstadium (HR = 1,057). Die übrigen eingeschlossenen Parameter fielen nacheinander beim Prozess der Datenselektion heraus (**Tabelle 14**).

Korrelationsanalysen auf Basis des Phi-Korrelationskoeffizienten ergaben keine signifikanten Korrelationen zwischen den jeweils paarweise geprüften Parametern der multivariaten Analyse.

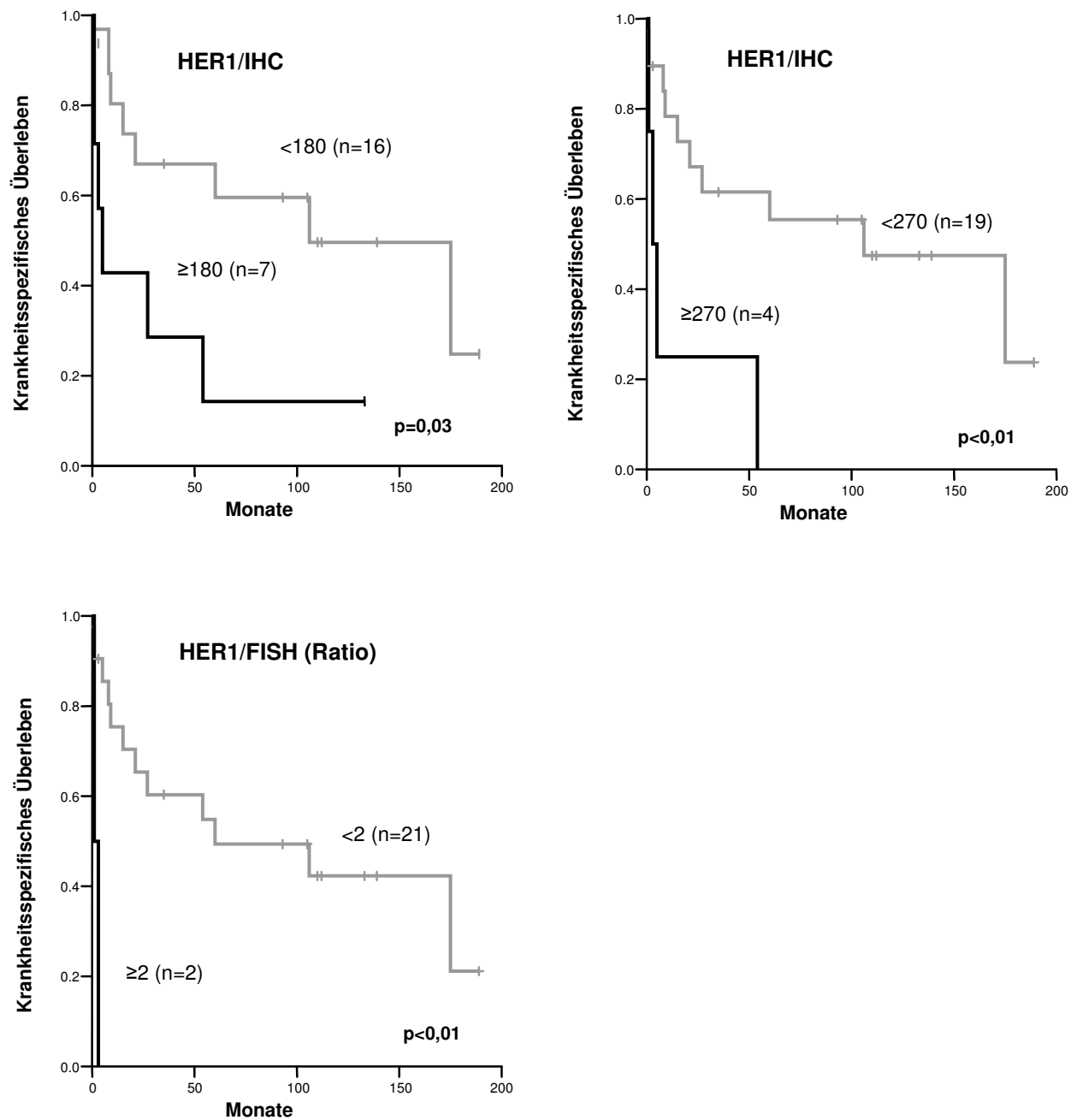
**Tabelle 14:** Univariate Analyse (Kaplan-Meier, Log Rank-Statistik) und multivariate Analyse (Cox-Regression mit schrittweise rückwärts ablaufender Datenselektion): berechnete p-Werte (OSCC-Kollektiv)

Variable	Kodierung	Univariat (n=23)	Multivariat (n=23)			HR (95% CI)
		Log Rank	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	
<b>Stadium</b>	I+II (n=11) vs. III+IV (n=12)	<b>0,03</b>	0,05	0,06	0,05	1,057 (1,000-1,117)
<b>Alter</b>	<80 (n=20) vs. ≥80 (n=3)	<b>0,02</b>	0,21	0,15		
<b>Her1/IHC</b>	<270 (n=19) vs. ≥270 (n=4)	<b>&lt;0,01</b>	0,53			
<b>Her1/FISH</b>	Ratio<2 (n=21) vs. ≥2 (n=2)	<b>&lt;0,01</b>	0,05	0,02	<b>0,02</b>	10,809 (1,518-76,977)

n = Anzahl der Patienten; HR = Hazard Ratio; CI = Konfidenzintervall; IHC = Immunhistochemie; FISH = Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.



**Abbildung 18:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven zu Tumorstadium, Patientenalter, R-Stadium und Tumorgrading der 23 oralen Plattenepithelkarzinome (OSCC-Kollektiv).



**Abbildung 19:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven zu HER1-Immunhistochemie und HER1-FISH der 23 oralen Plattenepithelkarzinome (OSCC-Kollektiv).

### 3.3. Vergleich von HNSCC- und OSCC-Kollektiv

#### 3.3.1. Immunhistochemische und zytogenetische Ergebnisse im Vergleich

In **Tabelle 15** sind die jeweiligen Fallzahlen der immunhistochemischen Auswertung und der beobachteten zytogenetischen Veränderungen in den beiden Subkollektiven noch einmal im Vergleich dargestellt. Für das HNSCC-Kollektiv wurden die 113 Fälle mit vollständigem Datenset (bis auf HER1-IHC; n = 107) verwendet.

**Tabelle 15:** Immunhistochemische und zytogenetische Analyse von HER1-4 des HNSCC- und OSCC-Kollektivs im Vergleich unter Angabe der jeweiligen Fallzahlen und der p-Werte entsprechend Fisher-Exakt-Test

	HER1/Chromosom 7			HER2/Chromosom 17		
	OC [n(%)]	HN [n(%)]	p	OC [n(%)]	HN [n(%)]	p
<b>IHC</b>						
pos. ( $\geq 180$ )	7 (30,4)	53 (49,5)	0,11	0 (0)	7 (6,2)	0,60
neg. ( $< 180$ )	16 (69,6)	54 (50,5)		23 (100)	106 (93,8)	
<b>FISH</b>						
Disomie	15 (65,2)	68 (60,2)	0,82	13 (61,9)	89 (78,8)	0,10
Polysomie	6 (26,1)	38 (33,6)		8 (38,1)	24 (21,2)	
Amplifikation	2 (8,7)	7 (6,2)		0 (0)	0 (0)	
	HER3/Chromosom 12			HER4/Chromosom 2		
	OC [n(%)]	HN [n(%)]	p	OC [n(%)]	HN [n(%)]	p
<b>IHC</b>						
pos. ( $\geq 180$ )	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
neg. ( $< 180$ )	23 (100)	113 (100)		23 (100)	113 (100)	
<b>FISH</b>						
Disomie	21 (91,3)	93 (82,3)	0,37	12 (52,2)	69 (61,1)	0,49
Polysomie	2 (8,7)	20 (17,7)		11 (47,8)	44 (38,9)	
Amplifikation	0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	

IHC = Immunhistochemie; FISH = Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; OC = OSCC-Kollektiv; HN = HNSCC-Kollektiv

Wie aus der Tabelle ersichtlich, wurde eine HER1-Überexpression in beiden Kollektiven relativ häufig beobachtet (30,4 % im OSCC-Kollektiv und 49,5 % im HNSCC-Kollektiv).

Eine HER2-Überexpression wurde anders als im HNSCC-Kollektiv in dem deutlich kleineren OSCC-Kollektiv nie beobachtet, allerdings waren auch im HNSCC-Kollektiv lediglich 6,2 % der Fälle für den HER2-Rezeptor überexprimiert.

Eine Überexpression des HER3- und HER4-Rezeptors konnte in keinem der beiden Kollektive beobachtet werden.

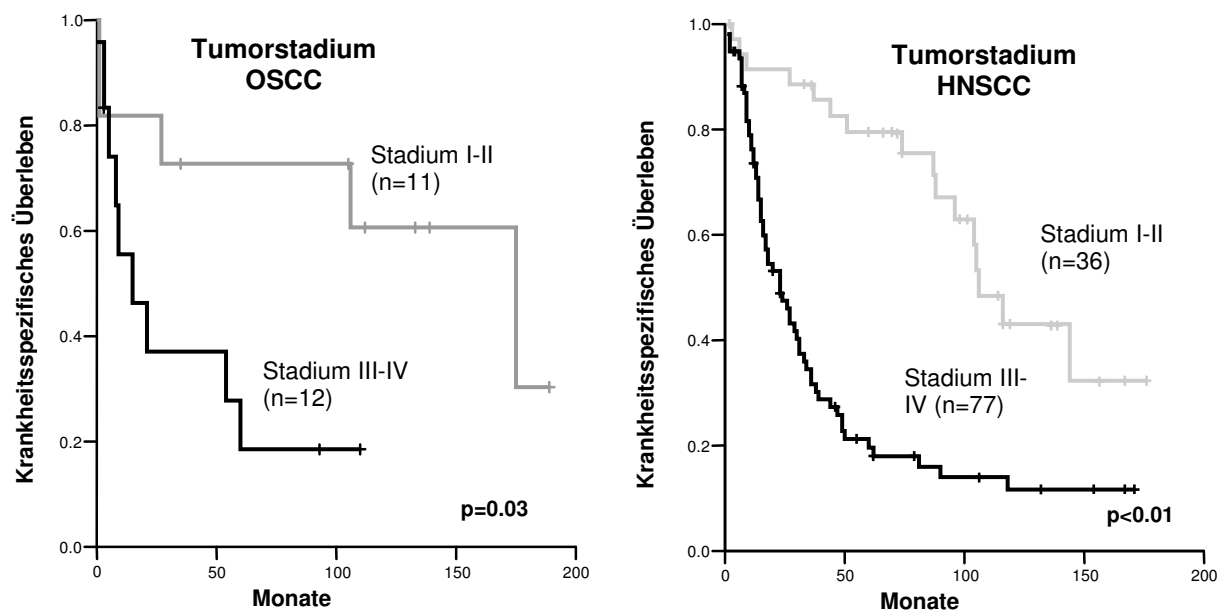
Die meisten zytogenetischen Aberrationen wurden im OSCC-Kollektiv auf Chromosom 2 detektiert, wo auch das HER4-Gen lokalisiert ist. Der Anteil der disomen Fälle lag hier nur knapp über 50 %. Auch im HNSCC-Kollektiv waren genetische Veränderungen auf Chromosom 2 relativ häufig. Genamplifikation des HER4-Lokus kam bei beiden Kollektiven nicht vor, jedoch lag der Prozentanteil der polysomen Fälle jeweils relativ hoch (47,8 % im OSCC-Kollektiv und 38,9 % im HNSCC-Kollektiv) bei insgesamt immer noch dominierendem disomen Anteil. Der geringste Anteil an disomen Fällen lag für das HNSCC-Kollektiv mit 60 % auf Chromosom 7. Chromosom 12 wies bei beiden Kollektiven die geringste Rate an zytogenetischen Veränderungen auf (8,7 % im OSCC-Kollektiv und 17,7 % im HNSCC-Kollektiv). Amplifikation der HER-Gene wurde sowohl bei den oralen Karzinomen als auch bei den anderen Lokalisationen nur am HER1-Lokus detektiert. Die anderen Rezeptorgene der EGFR-Familie (HER2, HER3, HER4) waren nie amplifiziert.

Über Fisher-Exakt-Tests wurde untersucht, ob hinsichtlich der jeweils beobachteten immunhistochemischen Expressionsmuster und der detektierten zytogenetischen Veränderungen lokalisationsabhängige Assoziationen bestehen. Da der Exakte Test nach Fisher nur bei Vierfeldertafeln eingesetzt werden kann, wurden bei der HER1-FISH die Fälle mit Polysomie und Amplifikation zusammengezählt und den Fällen mit disomer Signalkonstellation gegenübergestellt. Bei den übrigen FISH-Ergebnissen (HER2-4) lagen ohnehin Vierfeldertafeln vor, da eine Amplifikation nie beobachtet wurde. Es ergaben sich weder für die immunhistochemischen noch für die FISH-Resultate signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven (**Tabelle 15**).

### **3.3.2. Überlebensanalysen**

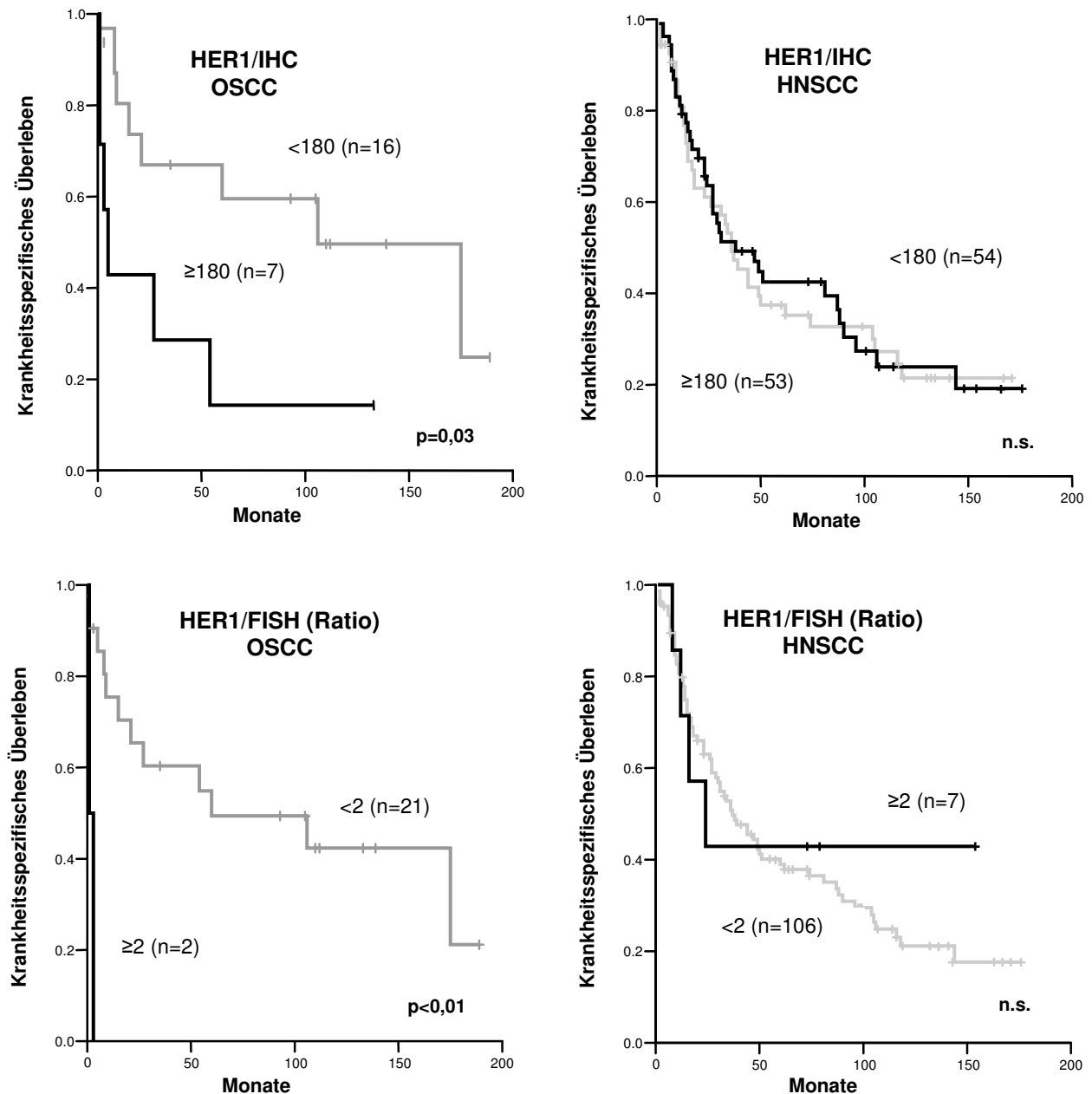
#### **3.3.2.1. Univariate Analysen im Vergleich**

Für beide Kollektive konnte die Repräsentativität der Fallauswahl durch Überlebensanalyse des klinisch etablierten Prognoseparameters Tumorstadium gezeigt werden: Fortgeschrittene Tumorstadien waren jeweils signifikant ( $p < 0,05$ ; Log Rank-Statistik) mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert (**Abbildung 20**).



**Abbildung 20:** Gegenüberstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven zum Tumorstadium der beiden Kollektive.

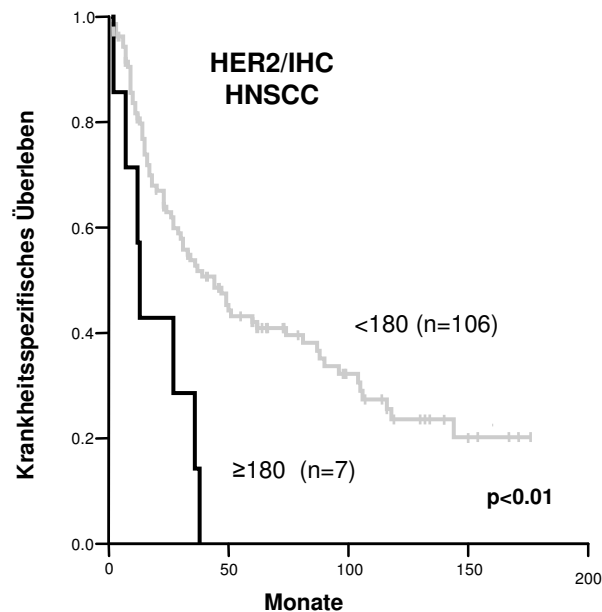
Hinsichtlich des prognostischen Einflusses der neu über Immunhistochemie und FISH ermittelten Parameter fielen zwischen den beiden Kollektiven Unterschiede auf. Bei den oralen Karzinomen war der HER1-Status sowohl aus immunhistochemischer als auch aus zytogenetischer Sicht von prognostischer Relevanz. Neben der Überexpression auf Proteinebene war auch eine Genamplifikation von HER1 signifikant mit einem kürzeren Überleben assoziiert. Im Gegensatz dazu war die immerhin in fast der Hälfte der HNSCC-Fälle vorliegende HER1-Überexpression ebenso wie die Amplifikation des HER1-Lokus in diesem Kollektiv nicht von prognostischer Bedeutung (**Abbildung 21**).



**Abbildung 21:** Gegenüberstellung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven zu HER1-Immunhistochemie und HER1-FISH der beiden Kollektive.

Demgegenüber erwies sich im HNSCC-Kollektiv eine HER2-Überexpression als prognostisch besonders ungünstig (**Abbildung 22**). Eine Überexpression des HER2-Rezeptors kam im OSCC-Kollektiv hingegen nicht vor.





**Abbildung 22:** Kaplan-Meier-Überlebenskurve zu HER2-Immunhistochemie des HNSCC-Kollektivs.

### 3.3.2.2. Multivariate Analysen im Vergleich

Wie zuvor gezeigt, erwiesen sich mit Ausnahme der HER1-Immunhistochemie die univariat für das jeweilige Kollektiv prognostisch bedeutsamen Parameter auch in der multivariaten Analyse als relevant. Im HNSCC-Kollektiv setzte sich der immunhistochemische HER2-Status als zweitwichtigster Prognosemarker hinter dem R-Status durch und im OSCC-Kollektiv blieb die HER1-Ratio mit einer Hazard Ratio von 10,809 als prognostisch bedeutsamster Parameter bis zum letzten Schritt in der Wertung (**Tabellen 9 und 14**).

Zur besseren Vergleichbarkeit der multivariaten Analysen wurden abschließend für die zwei Kollektive nochmals multivariate Cox-Regressionen mit Einschluss exakt der gleichen Parameter (Tumorstadium, R-Status, Patientenalter, HER1-Immunhistochemie, HER1-FISH, HER2-Immunhistochemie) durchgeführt. Nach schrittweise rückwärts ablaufender Datenselektion erwies sich im HNSCC-Kollektiv wiederum der immunhistochemische HER2-Status als prognostisch relevant (HR = 2,484), während sich im OSCC-Kollektiv die HER1-Ratio durchsetzte (HR = 10,805). Eine Zusammenfassung der einzelnen Schritte der multivariaten Analysen beider Kollektive in Zusammenschau mit den Ergebnissen der univariaten Analysen (Log Rank-Statistik) zeigt **Tabelle 16**.

**Tabelle 16:** Univariate Analyse (Kaplan-Meier, Log Rank-Statistik) und multivariate Analyse (Cox-Regression mit schrittweise rückwärts ablaufender Datenselektion) der beiden Kollektive im Vergleich: berechnete p-Werte

<b><u>HNSCC</u></b>		<b>Univariat (n=113)</b>	<b>Multivariat (n=113)</b>			
<b>Variable</b>	<b>Kodierung</b>	<b>Log Rank</b>	<b>Schr. 1</b>	<b>Schr. 2-3</b>	<b>Schr. 4</b>	<b>HR (95% CI)</b>
<b>Stadium</b>	I+II (n=36) vs. III+IV (n=77)	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	...	<b>&lt;0,01</b>	1,045 (1,017-1,074)
<b>R-Status</b>	R0 (n=91) vs. R1-2 (n=22)	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	...	<b>&lt;0,01</b>	9,459 (4,692-19,066)
<b>Alter</b>	<75 (n=102) vs. ≥75 (n=11)	0,67	0,12	...		
<b>HER1/IHC</b>	<180 (n=54) vs. ≥180 (n=59)	0,83	0,15	...		
<b>HER1/FISH</b>	Ratio<2 (n=106) vs. ≥2 (n=7)	0,73	0,24	...		
<b>HER2/IHC</b>	<180 (n=106) vs. ≥180 (n=7)	<b>&lt;0,01</b>	0,06	...	<b>0,04</b>	2,484 (1,039-5,938)
<b><u>OSCC</u></b>		<b>Univariat (n=23)</b>	<b>Multivariat (n=23)</b>			
<b>Variable</b>	<b>Kodierung</b>	<b>Log Rank</b>	<b>Schr. 1</b>	<b>Schr. 2-4</b>	<b>Schr. 5</b>	<b>HR (95% CI)</b>
<b>Stadium</b>	I+II (n=11) vs. III+IV (n=12)	<b>0,03</b>	0,05	...	0,05	1,057 (1,000-1,117)
<b>R-Status</b>	R0 (n=22) vs. R1-2 (n=1)	0,46	0,46	...		
<b>Alter</b>	<75 (n=17) vs. ≥75 (n=6)	0,41	0,52	...		
<b>HER1/IHC</b>	<180 (n=16) vs. ≥180 (n=7)	<b>0,03</b>	0,23	...		
<b>HER1/FISH</b>	Ratio<2 (n=21) vs. ≥2 (n=2)	<b>&lt;0,01</b>	0,09	...	<b>0,02</b>	10,805 (1,518-76,977)
<b>HER2/IHC</b>	-	-	-			

n = Anzahl der Patienten; HR = Hazard Ratio; CI = Konfidenzintervall; IHC = Immunhistochemie; FISH = Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; Schr. = Schritt

## **4. DISKUSSION**

### **4.1. Kritische Betrachtung der angewandten Methoden**

#### **4.1.1. TMA-Technik**

Sämtliche immunhistochemischen Färbungen und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen wurden an sogenannten Tissue-Microarrays (TMA) durchgeführt. Die Untersuchungen wurden also nicht direkt an Schnitten des Ursprungsgewebes vorgenommen. Vielmehr wurden aus den das jeweilige Ursprungsgewebe enthaltenden Paraffinblöcken die entsprechenden Gewebsbezirke herausgestanzt, in einen gemeinsamen neuen Paraffinblock (TMA-Block) eingebettet und davon die Schnitte angefertigt.

Diese Methode bringt mehrere Vorteile mit sich: Zum einen können nach der Durchführung nur einer immunhistochemischen Färbung bzw. DNA-Hybridisierung eine ganze Vielzahl von Proben evaluiert werden, was gegenüber der konventionellen Schnitt-Bearbeitung eine enorme Effizienzsteigerung bedeutet. Neben einem erheblich verringerten Zeitaufwand für die Färbungen lassen sich auf diese Weise vor allem auch die Kosten für wertvolle Materialien, wie z. B. für teure DNA-Sonden, reduzieren. Andererseits ermöglicht die Methode auch eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Resultate. Durch Behandlung aller Proben mit exakt der gleichen Prozedur können interexperimentelle Unterschiede minimiert werden. Hier sei aber auf die Voraussetzung hingewiesen, dass sich die Ursprungsgewebe hinsichtlich der Art der Probengewinnung, ihrer Lagerdauer in Paraffin und der Qualität des Einbettungsmaterials nicht zu sehr unterscheiden.

Neben den Vorteilen der experimentellen Uniformität und der Zeitersparnis bei der Durchführung der Färbungen darf man aber nicht den Aufwand bis zur Herstellung eines Arrays unterschätzen. Die Vorbereitung und Erstellung eines TMA nimmt viel Zeit in Anspruch. Alle Proben müssen vor der Array-Erstellung durchgesehen und die für die Fragestellung relevanten Gewebe markiert werden. Auch das Herausstanzen der Gewebezyylinder stellt einen zusätzlichen Aufwand dar. Dafür entfällt jedoch bei der endgültigen Auswertung unter dem Mikroskop das Aufsuchen spezieller Bereiche, da diese durch das Stanzen bereits selektiert wurden. Von entscheidender Bedeutung ist dabei natürlich die Repräsentativität des herausgestanzten Areals für die Originalläsion. Diese mag von Kritikern der Methode angezweifelt werden. Durch sorgfältige Vorbereitung lassen sich die gewünschten Gebiete jedoch sehr genau selektieren. Größere Evaluierungsstudien haben darüber hinaus gezeigt, dass selbst aus größeren Tumoren, die oft heterogen sind, gestanzte Gewebeproben signifikant repräsentativ für das

Ursprungsgewebe sind [Mirlacher et al., 2000; Moch et al., 2001; Torhorst et al., 2001]. TMAs stellen also bei adäquater Repräsentativität eine effiziente Methode dar, um mit relativ kleinem finanziellen und personellen Aufwand eine große Anzahl von Proben zu untersuchen.

#### **4.1.2. Immunhistochemie und FISH**

Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung stellen weltweit etablierte und anerkannte moderne Methoden in der pathologischen Zusatzdiagnostik und Forschung dar. Während die Immunhistochemie dem Nachweis bestimmter Strukturen auf Proteinebene dient, ist die FISH ein Detektionsverfahren auf DNA-Ebene. Durch Kombination beider Methoden kann man also zusätzliche Informationen gewinnen und gegebenenfalls Rückschlüsse über mögliche Zusammenhänge zwischen genetischen Aberrationen und Veränderungen des Expressionsstatus ziehen.

Die Methode der Immunhistochemie bietet dabei einige grundsätzliche Vorteile: die Technik ist in der Routinediagnostik weit verbreitet und die Kosten sind relativ gering. Weiterhin sind die Schnittpräparate einfach und dauerhaft aufzubewahren und die Befundung ist an einem laborüblichen Lichtmikroskop möglich.

Die FISH hingegen ist ein im Vergleich eher teures Verfahren. Eine einmal durchgeführte Hybridisierung muss außerdem relativ rasch ausgewertet werden, da die Fluoreszenzsignale nicht dauerhaft nachweisbar sind. Für die Auszählung der Signale benötigt man ein spezielles Fluoreszenzmikroskop.

Als nachteiliger Aspekt der Immunhistochemie ist aber zu berücksichtigen, dass die Qualität immunhistochemischer Studien aufgrund mehrerer Faktoren variiert. So führen individuelle Formen der Gewebepräparation je nach Studie und der Einsatz verschiedener Antikörper mit unterschiedlicher Bindungsspezifität zu nicht immer vergleichbaren Resultaten. Auch für FISH-Untersuchungen ist eine Vielzahl von Sonden mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften in Gebrauch. Für die Experimente der vorliegenden Studie wurden qualitativ hochwertige etablierte Sonden-Kits und Antikörper verwendet. Die Spezifität der eingesetzten Antikörper gegen HER3 und HER4 wurde in einer vorangehenden Studie von Sassen et al. gezeigt [Sassen et al., 2007]. Auch die vom auswertenden Pathologen abhängige und damit subjektive Interpretation der immunhistochemischen Färbemuster und -intensität spielt eine Rolle hinsichtlich der nicht uneingeschränkten Vergleichbarkeit vieler Studien.

Nicht zuletzt aufgrund einer unabhängigen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen durch zwei erfahrene Pathologen wird diese Studie dem hohen Qualitätsanspruch gerecht.

Auch bei der Interpretation der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierungen wurden die Ergebnisse nach der Erstbeurteilung durch einen unabhängigen zweiten Betrachter kontrolliert.

Weiterhin darf man nicht vergessen, dass beide Methoden einer Auswertung mit Bezug zur Morphologie bedürfen, da weder DNA-Sonden noch Antikörper zwischen neoplastischen und nicht-neoplastischen Geweben unterscheiden können. Um falsch-positive und falsch-negative Befunde durch z. B. nicht erfasstes Tumorgewebe zu vermeiden, wurde jede Stanze zuerst auf einem HE-gefärbten Schnitt beurteilt, so dass die Auswertung den morphologischen und den immunhistochemischen bzw. FISH-Befund widerspruchsfrei vereint [Dabbs, 2010; Leong et al., 2003; Taylor et al., 2006].

#### **4.2. Fragestellung der Arbeit im Kontext der bisherigen Literatur**

In den letzten Jahren wurden viele Studien durchgeführt, um neben den klassischen klinischen Parametern wie TNM-Stadium oder R-Status neuere zuverlässige molekulare und biologische Prognosemarker bei HNSCC-Patienten zu finden. Dabei gilt auch der Familie der HER-Rezeptortyrosinkinasen zunehmendes Interesse, nicht zuletzt vor dem Hintergrund neuerer verfügbarer innovativer Therapiestrategien. So sind für die Hemmung des HER2- und EGF-Rezeptors bereits spezifische Therapeutika etabliert.

In der letzten Zeit häuften sich Publikationen zur prognostischen Bedeutung der EGFR- und HER2-Expression in HNSCC. Aufgrund zum Teil uneinheitlicher Ergebnisse bleiben hinsichtlich der prognostischen Signifikanz dieser Parameter Fragen offen. So unterstützen manche Daten die Rolle der über verschiedene Methoden (Immunhistochemie, Durchflusszytometrie, RT-PCR) gemessenen EGFR- und/oder HER2-Expression als nützlichen Prognoseindikator [Cavalot et al., 2007; Hitt et al., 2005; O-charoenrat et al., 2002(1); Schartinger et al., 2004; Xia et al., 1997; Xia et al., 1999], während andere Studienergebnisse deren prognostischen Wert bei HNSCC in Frage stellen [Fischer et al., 2008; Khademi et al., 2002; Kearsley et al., 1991; Smilek et al., 2006].

Obwohl HER2 einen Orphan-Rezeptor darstellt, für den bisher noch kein Ligand identifiziert ist, spielt er durch seine Fähigkeit, mit anderen Rezeptoren der EGF-Familie über Heterodimer-Bildung in Wechselwirkung zu treten, doch eine entscheidende Rolle bei der Steuerung untergeordneter Signalwege. Diese allgemein akzeptierte Hypothese des Zusammenspiels der vier Rezeptoren als Reaktionspartner in Dimeren führt vor Augen, dass eine gemeinsame Be-

trachtung aller Mitglieder der Rezeptorfamilie erforderlich ist, um ihren prognostischen Wert sowie ihre Rolle als Therapieziel neuerer Medikamente besser einschätzen zu können. Insbesondere über den bei HNSCC am umfassendsten untersuchten EGF-Rezeptor und dessen prognostische Relevanz sowie Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern wird kontrovers diskutiert [O-charoenrat et al., 2002(2)]. Die Rolle von HER3 und HER4 in HNSCC ist hingegen noch wenig untersucht.

Neben Untersuchungen auf Proteinebene wurden jüngst auch vermehrt Analysen auf DNA-Ebene, wie die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung, unternommen [Chung et al., 2006; Khan et al., 2002; Scheer et al., 2003]. Chung et al. propagierten für Genamplifikation und/oder hohe Polysomie des HER1-Lokus in HNSCC ein kürzeres Gesamtüberleben im Vergleich zur Kontrollgruppe [Chung et al., 2006]. Die Untersuchung des Gen-Status bringt also neben der immunhistochemischen Evaluation der Expression möglicherweise zusätzliche Informationen hinsichtlich des prognostischen Potentials der Rezeptoren und trägt insbesondere auch zum besseren Verständnis pathobiologischer Mechanismen der Karzinogenese bei. Bisher gibt aber es noch wenige Studien an HNSCC, die diese beiden Detektionsmethoden – Immunhistochemie auf Proteinebene und FISH auf DNA-Ebene – verbinden.

Die vielfältigen Lokalisationen innerhalb des Spektrums der HNSCC mögen die Suche nach einem verlässlichen gemeinsamen Prognosemarker noch zusätzlich erschweren. Zwar ist das Plattenepithel des oberen aerodigestiven Traktes als Ganzes dem Einfluss von Karzinogenen ausgesetzt. Dennoch wird zunehmend der Frage nachgegangen, ob nicht eine gesonderte Betrachtung der verschiedenen Tumorlokalisationen aufschlussreichere Resultate bietet [Freier et al., 2003; Huang et al., 2002; Rodrigo et al., 2001; Takes et al., 1998; Xia et al., 1997]. Insbesondere die oralen Karzinome sollen sich möglicherweise von den anderen Karzinomen aus dem Spektrum der HNSCC unterscheiden [Xia et al., 1997].

Vor dem Hintergrund der aufgeführten Erkenntnisse sollten in der vorliegenden Studie alle vier Rezeptoren der HER-Familie sowohl immunhistochemisch als auch zytogenetisch über FISH untersucht werden und die Daten in Bezug zu klinischen Parametern, Gesamtüberleben und pathologischen Charakteristika wie Malignitätsgrad und Proliferationsaktivität (gemessen an der Ki-67-Expression) gesetzt werden. Dabei sollten die oralen Plattenepithelkarzinome getrennt von den Karzinomen der übrigen Lokalisationen betrachtet werden. Anschließend wurde anhand eines Vergleichs der Ergebnisse für die beiden Subkollektive untersucht, ob Hinweise für lokalisationstypische Veränderungen auf Protein- oder DNA-Ebene vorliegen.

### **4.3. Diskussion der Ergebnisse**

#### **4.3.1. Untersuchung des HNSCC-Kollektivs**

##### **4.3.1.1. Immunhistochemische Analyse von HER1-4**

Die Anzahl der auswertbaren Tumorproben bei den einzelnen immunhistochemischen Färbungen variierte zwischen 165 und 181 von insgesamt 219 vorhandenen Fällen. Als Ursache hierfür sind technische Gründe zu nennen (kein/zu wenig Tumorgewebe erfasst, Abschwimmen von Stanzen beim Färbeprozess).

In Übereinstimmung zu mehreren anderen Studien [Fischer et al., 2008; Ishitoya et al., 1989; Schartinger et al., 2004] zeigte auch in der vorliegenden Analyse etwa die Hälfte der untersuchten Tumoren im HNSCC-Kollektiv eine HER1-Überexpression. Grandis et al. stellten hingegen bei über 90 % der analysierten HNSCC eine erhöhte EGFR-Expression fest [Grandis et al., 1993]. Allerdings wurden in dieser Studie mRNA-Levels über Northern Blot detektiert und somit nicht unmittelbar Veränderungen auf Proteinebene erfasst.

In Gegensatz zu Cavalot et al., die in rund einem Viertel ihrer untersuchten Fälle hohe membranäre HER2-Expressionslevels detektierten, wurde für das vorliegende Kollektiv lediglich in 6 % der Tumoren eine HER2-Überexpression nachgewiesen. Dies könnte durch andere Scoring-Systeme sowie unterschiedlich definierte Positivitätskriterien bzw. Grenzwerte bei der immunhistochemischen Auswertung oder auch durch die Selektion der Tumorfälle bedingt sein. Das Kollektiv von Cavalot et al. schloss zum Beispiel auch Mundhöhlenkarzinome mit ein und es enthielt deutlich weniger Pharynxkarzinome als das in der vorliegenden Studie analysierte Kollektiv [Cavalot et al., 2007]. Eine noch geringere Prävalenz der HER2-Überexpression lag mit 3,1 % bei Schartinger et al. vor [Schartinger et al., 2004].

Auch hinsichtlich des HER3- und HER4-Status weichen die Beobachtungen zum Teil deutlich von der bestehenden Literatur ab. Während die in der vorliegenden Studie analysierten HNSCC-Fälle allesamt negativ für HER3 und HER4 waren, berichten andere Autoren über ein relativ häufiges Auftreten hoher Expressionsniveaus bei HNSCC auch für diese beiden Mitglieder der HER-Rezeptortyrosinkinasen: In einer Studie von O-Chaorenrat et al. zeigten 37 % der untersuchten Tumoren eine als hoch bewertete Koexpression von EGFR, HER2 und HER3, detektiert über RT-PCR, und in 26 % der Fälle waren alle vier Rezeptoren der EGF-Familie in hohen Leveln koexprimiert [O-charoenrat et al, 2002(1)]. Hier lag jedoch wiederum keine Detektion auf Proteinebene vor. Weitere Studien, allerdings auf die Lokalisation

Mundhöhle begrenzt, zeigten ebenfalls hohe Anteile an HER3-Überexpression [Xia et al., 1999; Shintani et al., 1995]. Diese beträchtliche Varianz zwischen diesen Berichten und der vorliegenden Studie könnte unter anderem durch die verschiedene Interpretation von Rezeptorpositivität bzw. -negativität und die individuelle Definition von Cut-off-Werten erklärbar sein. Eine große Rolle mag auch die Verwendung von Antikörpern unterschiedlicher Spezifität und Sensitivität spielen.

Diskutiert wird bei der immunhistochemischen Analyse der HER-Rezeptoren vielfach die Validität der Detektion einer zytoplasmatischen Färbung im Vergleich zur membranären Färbung. Während manche Autoren die zytoplasmatische Färbung der Rezeptoren als ebenso wichtig und spezifisch wie die membranäre Färbung erachten [Xia et al., 1999], bezweifeln andere deren Spezifität und argumentieren, dass möglicherweise Färbeartefakte aufgrund Antikörper-Kreuzreaktivität vorliegen könnten [De Potter et al., 1989; De Potter et al., 1990; Press et al., 1994]. Unter anderem soll der Prozess des Antigen-Retrieval bei der Entstehung dieser Färbephänomene eine Rolle spielen [Press et al., 1994]. Wenn auch vielfach über zytoplasmatische Färbemuster in Plattenepithelkarzinomen berichtet wurde [Field et al., 1992; Hou et al., 1992; Xia et al., 1999], so herrscht über deren richtige Interpretation noch Uneinigkeit. Fehlende Standardisierung und Mangel an Uniformität führen so unausweichlich zu eingeschränkter Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien. Wie bereits erwähnt, wurde in der vorliegenden Studie die membranäre Färbung bewertet. Dies deckt sich mit den Standardkriterien für die Beurteilung der HER2-Positivität beim Mammakarzinom [Jacobs et al., 1999]. Die Spezifität der verwendeten Antikörper gegen HER3 und HER4 wurde jüngst in einer Studie von Sassen et al. demonstriert [Sassen et al., 2008].

#### **4.3.1.2. Zytogenetische Analyse von HER1-4**

Zu der immunhistochemischen Analyse auf Proteinebene wurde eine zytogenetische Untersuchung der Genloci von HER1-4 und ihrer korrespondierenden Chromosomen ergänzt.

Aus verschiedenen technischen Gründen (kein/zu wenig Tumorgewebe erfasst, Abschwimmen von Stanzen beim Färbeprozess, keine detektierbaren FISH-Signale, z. B. durch Beeinträchtigung der DNA-Integrität bei der Formalinfixierung) variierte die Anzahl der auswertbaren Tumorproben bei den einzelnen Hybridisierungen zwischen 149 und 171 von insgesamt 219 vorhandenen Fällen.

Während für HER2-4 bei keinem der untersuchten Fälle eine Genamplifikation detektiert wurde, ergab die Evaluation des HER1-Genstatus in 8 von 155 auswertbaren Hybridisierungen (5,2 %) eine Amplifikation. Ein größerer Anteil an EGFR-amplifizierten Tumoren wird



von Chung et al. angegeben [Chung et al., 2006]. In deren Studie an 75 HNSCC waren nur 8 % der Karzinome normal disom in Bezug auf die HER1-Genkopien, während rund ein Drittel eine Genamplifikation aufwies. Im Gegensatz dazu präsentierte sich in der vorliegenden Analyse die Mehrzahl (60 %) der Tumoren als stabil hinsichtlich des HER1-Lokus; geringe Polysomie bzw. Trisomie lag in einem Viertel der Fälle vor (bei Chung et al. 34 %) und hohe Polysomie nur in etwa 10 % (bei Chung et al. 27 %). Diese Unterschiede könnten auf unterschiedliche Bindungseigenschaften der verwendeten Fluoreszenz-Sonden zurückzuführen sein. Auch verschiedene Definitionen hinsichtlich der Einordnung in die entsprechenden zytogenetischen Kategorien mögen eine Rolle spielen. So war bei der Definition der Trisomie/Polysomie in der vorliegenden Studie die Anzahl an Zentromersignalen entscheidend, während Chung et al. sich an der Anzahl der Genkopien orientierten. Dies erklärt jedoch nicht die große Varianz in der Kategorie Genamplifikation. Schließlich ist auch auf die unterschiedliche Selektion von Tumorproben hinzuweisen. Während diese Studie nur Primärtumoren von HNSCC-Patienten enthielt, waren im Kollektiv von Chung et al. auch Rezidiv-Fälle eingeschlossen, deren Aggressivität und molekulargenetisches Profil möglicherweise vom Ersttumor abweichen. Die Angaben zur Prävalenz der HER1-Genamplifikation bei HNSCC in anderen Studien sind mit den Ergebnissen dieser Arbeit hingegen besser vereinbar. In diesen wird Genamplifikation des HER1-Lokus - entgegen dem oft als hoch angegebenen Anteil der HER1-überexprimierenden Tumoren - ebenso als eher seltenes Ereignis beschrieben. So waren in einer aktuellen Studie von Fischer et al. bei über 50 % Immunhistochemie-Positivität nur 7,7 % der Tumoren am HER1-Lokus amplifiziert [Fischer et al., 2008]. Kearsley et al. beschrieben in 6,5 % ihrer analysierten Tumoren eine HER1-Amplifikation, detektiert über Southern Blot [Kearsley et al., 1991]. Mit der gleichen Methode stellten Leonard et al. und Irish et al. immerhin 10 % beziehungsweise 13 % HER1-amplifizierte HNSCC fest [Leonard et al., 1991; Irish et al., 1993].

Interessanterweise konnten auch diese Autoren in keinem ihrer untersuchten Fälle eine Amplifikation des HER2-Lokus feststellen. Dies trifft auch auf die Studie von Rodrigo et al. zu [Rodrigo et al., 1996(2)]. Sie schätzten die Anzahl der Genkopien der Loci HER1-3 über PCR-Technik ab und konnten weder für HER2 noch für HER3 einen amplifizierten Fall in ihrem Kollektiv von 59 HNSCC zeigen. In einer Studie von O-charoenrat et al. an 15 Zelllinien erwies sich ebenfalls keiner der vier untersuchten Rezeptoren mit Ausnahme HER1 als amplifiziert [O-charoenrat et al., 2001]. In einer FISH-Analyse von Freier et al. waren immerhin 3,6 % ihrer untersuchten HNSCC am HER2-Lokus amplifiziert, für den HER1-Lokus waren es knapp 13 % [Freier et al., 2003].

Auf die unterschiedlichen Methoden der genannten Autoren wurde bereits hingewiesen und ein direkter Vergleich der Studien muss wohl kritisch betrachtet werden. Während Techniken wie Southern Blot und PCR, vorwiegend verwendet in den älteren der aufgeführten Studien, lediglich eine Abschätzung der Anzahl an Genkopien erlauben, sind mit der in der vorliegenden Studie sowie von Chung et al., Freier et al. und Fischer et al. angewandten modernen Methode FISH genauere Informationen über jede einzelne Zelle zu erwarten.

Für die vorliegende Studie bedeutet der fehlende Nachweis einer HER2-Genamplifikation, dass als Ursache der in manchen Fällen beobachteten Überexpression auf Proteinebene andere Mechanismen diskutiert werden müssen. Denkbar sind z. B. Fehlregulationen von Transkriptionsfaktoren oder auf RNA-Ebene.

#### **4.3.1.3. Prognostische Bedeutung der untersuchten Parameter**

Zur Evaluation der prognostischen Relevanz der gewonnenen Daten aus den Immunhistochemie- und FISH-Auswertungen wurden Cox-Regressionen und Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt. Die Repräsentativität der Fallzusammensetzung wurde mittels Überlebensanalysen bekannter Prognosemarker wie TNM-Stadium und R-Status gezeigt. Fortgeschrittenes lokales Tumorwachstum, Lymphknotenmetastasierung und positiver R-Status waren hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) mit einem kürzeren krankheitsspezifischen Überleben assoziiert. Tumorgrading und Patientenalter stellten sich nicht als signifikante Prognosefaktoren dar. Der im Vergleich zu Tumordicke, Nodalstatus und M-Stadium sehr eingeschränkte prognostische Wert des Differenzierungsgrades bei HNSCC ist in der Literatur beschrieben [Barnes et al., 2005]. Positiver M-Status zeigte jedoch keine signifikante prognostische Relevanz im vorliegenden Kollektiv, was dadurch zu erklären ist, dass lediglich bei einem von 219 Patienten Fernmetastasen dokumentiert waren.

Bei der Überlebensanalyse der immunhistochemischen Daten für HER1-4 stellte sich allein HER2 signifikant als negativer Prognosemarker heraus. Damit werden frühere Studien bestätigt, deren Daten ebenfalls für den prognostischen Einfluss der HER2-Expression sprechen [Cavalot et al., 2007; O-charoenrat et al., 2002(1); Schartinger et al., 2004; Xia et al., 1997]. Im Gegensatz zum HER2-Status erwies sich die HER1-Expression in der vorliegenden Studie nicht als prognostisch relevant. Dies wurde bereits überzeugend von mehreren Autoren publiziert [Fischer et al., 2008; Schartinger et al., 2004], während andere Studien für HER1-Positivität ein schlechteres Outcome implizieren [O-charoenrat et al., 2002(1); Xia et al., 1999]. Fischer et al. kamen nach Analyse ihres über 300 Fälle umfassenden HNSCC-Kollektivs, die weder einen Einfluss auf das Gesamtüberleben noch relevante klinisch-

pathologische Assoziationen ergab, zu dem Schluss, dass der Stellenwert der EGFR-Expression in HNSCC möglicherweise überschätzt wird [Fischer et al., 2008]. O-charoenrat et al. nahmen in einem Review Stellung zu der kontrovers diskutierten Thematik und den vielfach widersprüchlich anmutenden Resultaten zahlreicher Studien [O-charoenrat et al., 2002(2)]. Mögliche Gründe für die verschiedenen Ergebnisse könnten erklärt werden durch unterschiedliche Methoden der Gewebeaufbereitung sowie der Detektion der Rezeptorexpression (Immunhistochemie, Bestimmung von mRNA-Levels über RT-PCR). Genauso kommen Unterschiede in der Fallselektion (verschiedene Tumorlokalisationen, Primärtumoren oder Rezidivfälle, Verteilung auf die Tumorstadien) und in der Anwendung statistischer Tests in Betracht. Ferner müssen möglicherweise auch die verschiedenen Ätiologien der Karzinome bedacht werden. Beispielsweise könnten durch virale Infektionen Modulationen der EGFR-Expression und damit als Folge Abweichungen der statistischen Ergebnisse denkbar sein [Walker et al., 2009]. In der Tat werden HPV-positive Tumoren mitunter als eigenständige Entität unter den HNSCC beschrieben: Sie unterscheiden sich hinsichtlich des molekulargenetischen Profils, betreffen häufiger jüngere Patienten und sind im Vergleich zu HPV-negativen Karzinomen mit einer besseren Prognose assoziiert [Gillison et al., 2000; Gillison, 2004; Goon et al., 2009; Klussmann et al., 2003; Ringström et al., 2002; Ritchie et al., 2003; Schwartz et al., 2001; Smith et al., 2004; Strome et al., 2002].

Auch bei der zytogenetischen Evaluation des HER1-Rezeptors ergab sich keine signifikante prognostische Relevanz aus den vorliegenden Daten. Im Gegensatz zu Chung et al., bei dem FISH-Positivität mit einem negativen prognostischen Einfluss assoziiert war [Chung et al., 2006], stand eine Amplifikation des HER1-Lokus nicht in Zusammenhang mit einem kürzeren krankheitsspezifischen Überleben.

Eine Assoziation zwischen Rezeptorüberexpression und Genamplifikation konnten Chung et al. allerdings nicht feststellen. Hingegen spricht die signifikante Assoziation zwischen immunhistochemischen und FISH-Daten in der vorliegenden Studie für einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Amplifikation des HER1-Lokus und einer Rezeptorüberexpression. Da bei 66 Fällen jedoch eine Rezeptorüberexpression ohne begleitende Genamplifikation vorlag, müssen auch andere Mechanismen als Ursache für die Überexpression auf Proteinebene diskutiert werden, wie z. B. posttranskriptionale und/oder posttranslationale Fehlregulationen.

Chung et al. räumten weiterhin ein, dass der gezeigte prognostische Einfluss der FISH-Positivität möglicherweise nicht allein auf EGFR zurückzuführen ist, sondern dass die zytogenetischen Veränderungen am HER1-Lokus unter Umständen als Surrogatparameter für eine

allgemeine chromosomale Instabilität stehen. Durch die Untersuchung aller vier Rezeptoren, die ihrerseits auf vier unterschiedlichen Chromosomen kodiert sind, konnten in der vorliegenden Arbeit genauere Aussagen über eine mögliche Akkumulation von Polysomien im Sinne einer chromosomalen Instabilität gemacht und auch deren prognostische Bedeutung ermittelt werden. Chromosomale Instabilität/Aneuploidie wurde definiert als gleichzeitiges Vorkommen von geringer oder hoher Polysomie in mindestens drei der vier untersuchten Chromosomen (2, 7, 12, und 17). Dieses Kriterium erfüllten 21 Fälle des HNSCC-Kollektivs. Für diese Patientengruppe zeigte sich signifikant ein kürzeres Gesamtüberleben. Polysomien von Chromosom 9 und 17 wurden in der Literatur bereits mit der Expression von p53 korreliert und als prognostisch ungünstige Prädiktoren beschrieben [Charuruks et al., 1999]. Auch durchflusszytometrische Analysen zum DNA-Gehalt in HNSCC unterstützen die vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von Aneuploidie: wie durch Rubio Bueno et al. gezeigt, ist ein hoher Gehalt an Tumor-DNA mit einem schlechteren krankheitsfreien Überleben assoziiert [Rubio Bueno et al., 1998]. Oya et al. stellten eine signifikante Assoziation zwischen einer hohen S-Phase-Fraktion und der Entstehung von regionalen Lymphknotenmetastasen fest [Oya et al., 2002]. Über Messungen der DNA-Ploidie in HNSCC wurde auch in Zusammenhang mit Untersuchungen der Tumor-Proliferationsaktivität berichtet [Hass et al., 2008]. In der vorliegenden Studie wurde die Proliferationsaktivität der Tumoren über immunhistochemische Bestimmung der Ki-67-Expression bestimmt. Eine Proliferationsfraktion von mindestens 70 % positiv gefärbten Zellen war signifikant mit einer schlechteren Prognose assoziiert ( $p = 0,02$ ). Diese Beobachtung deckt sich mit anderen Berichten [Smilek et al., 2006; Silva et al., 2004].

Um die prognostisch bedeutsamen neuen Parameter auf relevante Assoziationen mit bekannten Prognosemarkern zu untersuchen, wurden Kontingenztabellen aufgestellt und diese jeweils über Fisher-Exakt-Test auf Assoziation geprüft. Dabei zeigte sich lediglich zwischen immunhistochemischer HER2-Expression und dem als Prognosemarker fest etablierten Lymphknotenstatus eine signifikante Assoziation ( $p = 0.01$ ). Eine signifikante Assoziation zwischen HER2-Expression und Lymphknoteninfiltration wurde auch von O-charoenrat et al. beschrieben [O-charoenrat et al., 2002(1)].

Die abschließende multivariate Cox-Regressions-Analyse sollte zusätzlich die prognostische Relevanz der zuvor genannten Parameter in Relation zu den bekannten Prognosefaktoren evaluieren. Nach schrittweise rückwärts ablaufender Datenselektion blieben nur T-Stadium, R-Stadium und HER2-Expression als hochsignifikante ( $p < 0,01$ ) Variablen in der Gleichung.

Eine Korrelationsanalyse auf Basis des Phi-Korrelationskoeffizienten demonstrierte die Unabhängigkeit von HER2, Ki-67 und Aneuploidie von allen anderen klinisch-pathologischen Parametern.

Die Überlebensanalysen in Zusammenschau mit den Assoziations- und Korrelationsuntersuchungen der vorliegenden Studie erlauben also die Schlussfolgerung, dass die HER2-Expression einen verlässlichen, von den meisten anderen klinisch-pathologischen Parametern unabhängigen negativen Prognosemarker in HNSCC darstellt. Hohe Proliferationsaktivität und chromosomale Instabilität sind weitere prognostisch bedeutsame Variablen, allerdings von niedrigerer Signifikanz. Hinsichtlich der anderen drei Rezeptoren sind weder Veränderungen auf DNA-Ebene noch auf Proteinebene von signifikanter prognostischer Bedeutung. Die Tatsache, dass die oftmals als prognostisch bedeutsam vermutete Rolle des HER1-Rezeptors in dieser Studie nicht bestätigt werden konnte, steht in Einklang mit anderen Autoren. Zusammen mit mehreren vorangegangenen Publikationen zur Bedeutung von HER2 in HNSCC, stellt die Studie vielmehr den prognostischen Wert der immunhistochemischen Bestimmung des HER2-Status in HNSCC heraus.

Entgegen den Erkenntnissen beim Mammakarzinom [Lottner et al., 2005] ergab sich in der vorliegenden Studie kein Anhalt für einen möglichen Zusammenhang zwischen Überexpression auf Proteinebene und Genamplifikation des HER2-Lokus.

#### **4.3.2. Untersuchung des OSCC-Kollektivs**

##### **4.3.2.1. Immunhistochemische Analyse von HER1-4**

Aufgrund von möglicherweise gegebenen molekulargenetischen Besonderheiten der oralen Plattenepithelkarzinome im Vergleich zu den anderen Lokalisationen aus dem Spektrum der HNSCC wurde die Lokalisation Mundhöhle (23 Fälle) in der vorliegenden Studie gesondert untersucht.

Die immunhistochemische Analyse der HER-Rezeptoren ergab in 7 von 23 Fällen (30,4 %) eine Überexpression des EGF-Rezeptors. 4 Fälle davon wiesen mit einem Score von 270 Punkten und mehr eine besonders hohe Überexpression auf, was einem Anteil von 17,4 % insgesamt entspricht. In der Literatur werden mitunter deutlich höhere Zahlen für HER1-überexprimierende Tumoren angegeben. Reimers et al. und Preuss et al. berichteten über 43 bzw. 50 % HER1-überexprimierte Tumoren, allerdings untersuchten sie Karzinome des Oropharynx [Reimers et al., 2007; Preuss et al., 2008]. Chiang et al. wiesen in ihrer Studie an 42 oralen Plattenepithelkarzinomen in 62 % der Fälle hohe Expressionsniveaus nach [Chiang

et al., 2008]. Bei Diniz-Freitas et al. zeigten sogar 74,5 % eine mittelgradige oder starke HER1-Expression und Ryott et al. klassifizierten 72 % ihrer untersuchten Zungenkarzinome als stark exprimiert für HER1 [Diniz-Freitas et al., 2007; Ryott et al., 2009].

Diese unterschiedlichen Beobachtungen könnten wiederum durch mangelnde Uniformität bei der Vorbereitung, Durchführung und Interpretation der immunhistochemischen Färbungen in den verschiedenen Studien erklärt werden. Zwar bewerteten Diniz-Freitas et al. wie in der vorliegenden Studie nur die membranäre EGFR-Färbung, dennoch weichen die Definitionskriterien zur Evaluation des HER1-Status der beiden Studien voneinander ab. Chiang et al. konnten im Gegenzug nur gelegentlich eine membranäre Färbung detektierten, überwiegend wurden zytoplasmatische und nukleäre Färbemuster beschrieben. Die Diskussion über die unterschiedliche Lokalisation der EGFR-Anfärbung innerhalb der Zelle wurde im Rahmen der Diskussion der HNSCC-Ergebnisse bereits angesprochen. Weitere Studien zur Ermittlung des lokalisationsabhängigen Phosphorylierungs- und damit Aktivitätszustandes des Rezeptors, wie von Chiang et al. vorgeschlagen, könnten möglicherweise hilfreich sein. Schließlich könnten die uneinheitlichen Ergebnisse auch durch die Art der Fallselektion bedingt sein. Ryott et al. untersuchten ausschließlich Zungenkarzinome und das Kollektiv von Chiang et al. umfasste nur männliche Patienten mit Kautabak-Konsum in der Anamnese. Molekulare Heterogenität durch unterschiedliche ätiologische Mechanismen der Karzinogenese ist folglich nicht ausgeschlossen. So stellten Ryott et al. bei Karzinomen von Nichtrauchern signifikant höhere HER1-Expressionslevels fest. Die Rauchgewohnheiten der Patienten der vorliegenden Studie wurden hingegen nicht evaluiert.

Eine Überexpression der anderen drei Rezeptoren der EGFR-Familie (HER2-HER4) wurde in der vorliegenden Studie nie beobachtet. Der höchste detektierte Score für HER2 lag bei 100 Punkten. Im Gegensatz dazu lag der Anteil der HER2-überexprimierten Tumoren bei Scheer et al. bei 11 % und Silva et al. stellten sogar bei 77,5 % ihrer untersuchten Karzinome eine starke HER2-Positivität fest [Scheer et al., 2003; Silva et al., 2008]. Wiederum steht an dieser Stelle die Frage einer direkten Vergleichbarkeit im Raum. Silva et al. beschrieben unter anderem eine inverse Korrelation zwischen intrazytoplasmatischer und membranärer HER2-Färbung, geben aber nicht an, wie diese Färbemuster innerhalb der beschriebenen Fälle mit starker HER2-Positivität verteilt waren.

Kritisch muss natürlich an dieser Stelle auch die geringe Fallzahl der vorliegenden Studie betrachtet werden, wodurch ebenfalls von der Literatur abweichende Resultate denkbar sind. Orientiert man sich hinsichtlich der zu erwartenden Häufigkeit der HER2-Überexpression unter Vernachlässigung des Aspektes der unterschiedlichen Tumorlokalisation an den beo-

bachteten 6,6 % im HNSCC-Kollektiv, wird deutlich, dass 23 Fälle zur Evaluation der Bedeutung des HER2-Status nicht ausreichen. Die Studie von Silva et al. umfasste hingegen mit 102 Fällen ein gut viermal größeres Kollektiv, jedoch waren nur Zungenkarzinome eingeschlossen.

Große Unterschiede fallen beim Vergleich der vorliegenden Studie mit anderen auch hinsichtlich der Angaben zur HER3- und HER4-Positivität auf. Xia et al. klassifizierten rund ein Drittel ihrer analysierten oralen Plattenepithelkarzinome als mittelstark oder hoch exprimiert für HER3, bei HER4 waren es 50 % der Fälle [Xia et al., 1999]. Shintani et al. bewerteten mit 46 % ebenfalls einen hohen Prozentanteil ihres untersuchten Kollektivs als überexprimiert für HER3 [Shintani et al., 1995]. Die nachgewiesenermaßen hochspezifische Anfärbung von HER3 und HER4 in der vorliegenden Studie stellt aber hier trotz der kleinen Fallzahl ein Argument für ihren dennoch hohen qualitativen Wert dar [Sassen et al., 2008], während die bei Xia et al. beschriebene Detektion zytoplasmatischer Färbemuster kritisch betrachtet werden muss.

#### **4.3.2.2. Zytogenetische Analyse von HER1-4**

Neben den immunhistochemischen Untersuchungen wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auch Gen- und Zentromerstatus der HER-Rezeptorgene und ihrer korrespondierenden Zentromere ermittelt.

Eine Genamplifikation von HER2-HER4 lag in keinem der Fälle vor, während für das HER1-Gen zwei der 23 Fälle (8,7 %) amplifiziert waren. Mit 33 % lag der Anteil der HER1-Genamplifikation bei Chiang et al. deutlich höher [Chiang et al., 2008]. Allerdings wurde hier Genamplifikation nur anhand der Anzahl der detektierten Genkopien definiert und dabei bereits Fälle ab zwei Genkopien als amplifiziert gewertet. Fünf Genkopien und mehr wurden in dieser Studie lediglich bei 12 % der Fälle beobachtet. Nur diese wenigen Fälle mit einer höheren Anzahl an Genkopien sind mit der Definition der Genamplifikation in der vorliegenden Studie, nämlich einer Gen/Zentromer-Ratio  $\geq 2$  tatsächlich vergleichbar. Jedoch konnten Ryott et al. in einer sehr aktuellen Studie sogar in 54 % ihrer 65 untersuchten Fälle vier oder mehr HER1-Genkopien detektieren [Ryott et al., 2009]. Dieser beträchtliche Unterschied ist möglicherweise auf die Verwendung anderer DNA-Sonden zurückzuführen. Ferner sind wiederum Unterschiede durch die Art der Fallselektion denkbar. So wurden durch Ryott et al. ausschließlich Zungenkarzinome untersucht. Die angegebene Häufigkeit polysomer Fälle bei Ryott et al. (29 %) deckt sich aber in etwa mit dem entsprechenden Anteil der vorliegenden Studie, bei der 26 % eine geringe oder hohe Polysomie von Chromosom 7 aufwiesen.

Zur Evaluation der Genamplifikation der anderen drei HER-Rezeptorgene sind bisher erst wenige Studien allein an oralen Karzinomen durchgeführt worden. Khan et al. führten an einem gemischten Kollektiv, das neben Mundhöhlenkarzinomen auch Oropharynxkarzinome enthielt, als erste Gruppe zusätzlich zur Immunhistochemie auch zytogenetische Analysen des HER2-Gens durch [Khan et al., 2002]. Allerdings wurden nur an lediglich 16 Tumorproben FISH-Färbungen durchgeführt. 4 Fälle davon (25 %) waren mit einer Ratio  $\geq 2$  am HER2-Gen amplifiziert und 7 Fälle (44 %) wiesen eine Polysomie des Chromosoms 17 auf. Auch in der vorliegenden Studie wurde bei 8 von 21 (38 %) auswertbaren HER2-Hybridisierungen eine Polysomie von Chromosom 17 festgestellt, während eine Genamplifikation des HER2-Lokus nie beobachtet wurde. Es bedarf zweifellos noch weiterer Studien mit größeren Fallzahlen, um aussagekräftigere Informationen über die Bedeutung der HER2-Amplifikation bei oralen Karzinomen zu erhalten. An immerhin 42 über FISH analysierten Tumorproben aus oralen Plattenepithelkarzinomen konnten Scheer et al. sogar in 33 % der Fälle eine HER2-Amplifikation feststellen, jedoch wurden für die Hybridisierung andere Sonden von möglicherweise unterschiedlicher Detektionssensitivität und -spezifität als in der vorliegenden Studie verwendet [Scheer et al., 2003]. Über doppelt so viele Fälle (85 OSCC) umfasste eine ältere Studie von Werkmeister et al., in der die Anzahl der Genkopien von HER1-HER3 über dd-PCR untersucht wurde [Werkmeister et al., 1996]. In Abhängigkeit von bekannten klinisch-pathologischen Parametern wurde jeweils die durchschnittliche Anzahl der Genkopien ermittelt. Für HER2 wurden mitunter Werte von über 3 Genkopien angegeben, für HER1 lagen die Werte immer unter 2 und für HER3 fast ausschließlich unter 1. Aufgrund einer anderen Detektionsmethode ist diese Analyse natürlich wiederum nicht direkt mit der vorliegenden Studie vergleichbar. Dennoch deutet ihr Ergebnis darauf hin, dass eine hohe Anzahl von Genkopien für HER3 im Sinne einer Genamplifikation möglicherweise bei OSCC nicht zu erwarten ist, was die vorliegende Studie bestätigt.

#### **4.3.2.3. Prognostische Bedeutung der untersuchten Parameter**

Anhand von Überlebensanalysen (Cox-Regression, Kaplan-Meier-Analyse) wurde im Anschluss die prognostische Bedeutung der immunhistochemischen und zytogenetischen Daten des OSCC-Kollektivs ermittelt. Zuvor konnte die Repräsentativität der Fallauswahl durch Überlebensanalyse des Tumorstadiums, einem etablierten klinischen Prognosemarker, gezeigt werden ( $p < 0,05$ ). N-, M- und R-Status waren aber aufgrund der kleinen Fallzahl keine signifikanten Prognosemarker, was sicherlich einen Kritikpunkt der vorliegenden Studie darstellt.



Hinsichtlich Immunhistochemie stellte sich lediglich der HER1-Status als prognostisch bedeutend heraus. Sowohl in der Cox-Regression als auch in der Kaplan-Meier-Analyse waren hohe HER1-Expressionslevels hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert. Dies steht in Einklang mit einer Studie von Störkel et al. an 100 oralen Plattenepithelkarzinomen, deren Daten ebenfalls für EGFR als signifikanten Prognosefaktor sprechen [Störkel et al., 1993]. Hitt et al. schlugen Mundhöhlenlokalisation und EGFR-Status als unabhängige Prognosemarker vor [Hitt et al., 2005]. Diese Studie bezog sich allerdings auf Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren und Chemotherapie. Reimers et al. konnten für hohe HER1-Expression lediglich einen Trend in Richtung kürzeres Gesamt- und tumorfreies Überleben feststellen [Reimers et al., 2007]. Auch Kiyota et al., die die Ratio aus EGFR/t-EGFR als signifikanten negativen Prognosemarker vorschlugen, schrieben dem HER1-Rezeptor eine wesentliche prognostische Rolle zu [Kiyota et al., 2000]. Andere Studien hingegen konnten keinen relevanten prognostischen Einfluss für den EGFR-Status belegen [Diniz-Freitas et al., 2007; Hiraishi et al., 2006; Preuss et al., 2008; Ryott et al., 2009].

Xia et al. implizierten im Gegenzug für die Überexpression aller vier HER-Rezeptoren einen ungünstigen Einfluss in Bezug auf das Gesamtüberleben. Das statistisch signifikante prognostische Potential sei durch Kombination von HER1-3, nicht aber HER4 jeweils noch zu verbessern [Xia et al., 1999]. Im Gegensatz dazu imponierten in der vorliegenden Studie HER2-4 nicht als relevante Prognoseindikatoren.

An dieser Stelle muss wiederum auf die unterschiedliche Interpretation immunhistochemischer Färbemuster hingewiesen werden, was nicht nur die vergleichende Analyse rein deskriptiver Angaben hinsichtlich Rezeptorpositivität und -negativität erschwert, sondern erst recht die vergleichende Interpretation von ermittelten Assoziationen hinsichtlich Überleben und klinisch-pathologischer Parameter. Diese Problematik lässt sich in besonderer Deutlichkeit am Ergebnis von Silva et al. erkennen, die für die Fälle mit zytoplasmatischem HER2-Färbemuster signifikant eine schlechtere Prognose zeigten, nicht jedoch für die Fälle mit membranärer Färbung [Silva et al., 2008]. Nur diese wurden aber in der vorliegenden Studie überhaupt berücksichtigt.

Überlebensanalysen der zytogenetischen Daten ergaben ebenfalls nur für HER1 prognostische Relevanz: Die Fälle mit einer Gen/Zentromer Ratio  $\geq 2$  waren signifikant mit einem kürzerem Gesamtüberleben assoziiert. Die prognostische Signifikanz einer HER1-Genamplifikation bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs wurde jüngst von Chung et al. demonstriert [Chung et al., 2006]. Jedoch gibt es bisher wenige Studien, die sich gezielt auf den prognostischen Wert einer HER1-Amplifikation bei Mundhöhlenkarzinomen beziehen. Chiang et al.

untersuchten die Anzahl der HER1-Genkopien bei oralen Karzinomen über PCR, machten aber keine Angabe über den Einfluss einer Amplifikation auf das Überleben [Chiang et al., 2008]. Werkmeister et al. demonstrierten für das Vorhandensein von 1,2 oder mehr HER2-Genkopien, ebenfalls detektiert über PCR, einen negativen Einfluss hinsichtlich krankheitsfreiem Überleben [Werkmeister et al., 1996]. Eine prognostische Bedeutung für den HER1-Genstatus konnten sie jedoch nicht zeigen. Dies trifft auch auf eine sehr aktuelle Studie von Ryott et al. zu, die als erste Arbeitsgruppe Immunhistochemie und FISH zur Evaluation des HER1-Status ausschließlich an Tumoren der Mundhöhle kombinierten, allerdings begrenzt auf Zungenkarzinome [Ryott et al., 2009]. Wie in der vorliegenden Analyse waren HER1-FISH und Immunhistochemie signifikant miteinander assoziiert. Beide Parameter zeigten aber keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben. Trotz fehlenden prognostischen Einflusses in Bezug auf das Gesamtüberleben zeigte sich aber eine signifikante Assoziation zwischen FISH-Positivität und fortgeschrittenen Tumorstadien.

Auch in der vorliegenden Studie wurden HER1-Immunhistochemie-Positivität und HER1-FISH-Positivität (Ratio  $\geq$ ) auf Assoziationen mit klinisch-pathologischen Parametern untersucht. Über Fisher-Exakt-Test konnten signifikante Assoziationen mit TNM-Stadium, R-Status, Tumordifferenzierungsgrad und Patientenalter ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu berichten andere Autoren über relevante Assoziationen des HER1-Status mit etablierten Prognosemarkern. Störkel et al. stellten für Karzinome von niedrigem Differenzierungsgrad signifikant höhere HER1-Expressionsniveaus fest [Störkel et al., 1993]. Nach Chiang et al. war eine hohe Anzahl an HER1-Genkopien mit positivem Lymphknotenstatus assoziiert [Chiang et al., 2008]. Wie in der vorliegenden Studie bestand aber keine relevante Assoziation mit dem Tumorstadium. In der bereits mehrfach zitierten Studie von Xia et al. lagen signifikante Assoziationen zwischen Expression aller HER-Rezeptoren und Nodalstatus sowie Fernmetastasierung vor [Xia et al., 1999]. Gründe für eingeschränkte Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Analyse wurden schon genannt.

Zusammenfassend schlägt die vorliegende Studie also den immunhistochemischen und zytogenetischen HER1-Status als einen von den bekannten klinisch-pathologischen Parametern unabhängigen Prognoseindikator bei Mundhöhlenkarzinomen vor. Der prognostische Einfluss der HER1-Ratio zeigte sich dabei auch bei multivariater Testung in Relation mit anderen Prognosemarkern als prognostisch bedeutsam. Dabei muss allerdings die geringe Fallzahl kritisch betrachtet werden, die die statistische Aussagekraft der Studie natürlich limitiert. Untersuchungen an größeren Kollektiven sind unabdingbar für eine aussagekräftigere und reprä-

sentativere Einschätzung zur Bedeutung der HER-Rezeptortyrosinkinasen in Mundhöhlenkarzinomen, nicht zuletzt um lokalisationspezifische Veränderungen als solche zu erkennen und um mehr Klarheit über möglicherweise auch therapierelevante Charakteristika zu erhalten.

#### **4.3.3. Vergleichende Analyse von HNSCC- und OSCC-Kollektiv**

Obwohl die Karzinome aus dem Spektrum der HNSCC eine histopathologische Einheit darstellen, tragen möglicherweise doch lokalisationspezifische molekularbiologische Charakteristika zu voneinander abweichenden klinischen Verhaltensweisen bei. In den meisten Studien werden Plattenepithelkarzinome dieser Regionen als eine gemeinsame Entität behandelt. Andere Autoren hingegen haben gezielt lokalisationstypische Veränderungen untersucht [Freier et al., 2003; Huang et al., 2002; Rodrigo et al., 2001; Takes et al., 1998; Xia et al., 1997]. Auch in der vorliegenden Studie wurden durch getrennte Betrachtung der oralen Karzinome von den übrigen HNSCC-Tumorlokalisationen anatomische Faktoren berücksichtigt. Die vergleichende Gegenüberstellung von HNSCC-Kollektiv und OSCC-Kollektiv ergab zwar gewisse lokalisationsabhängige Unterschiede hinsichtlich Expressions- und Genstatus der Wachstumsfaktorrezeptoren. Diese waren aber nicht statistisch signifikant.

Eine HER2-Überexpression konnte nur im HNSCC-Kollektiv nachgewiesen werden, nicht jedoch bei den oralen Karzinomen. Hingegen machten Xia et al. eine dazu konträre Beobachtung: Sie untersuchten über Westernblot-Technik mehrere HNSCC-Zelllinien auf HER2-Expression und fanden bei den drei OSCC-Linien hohe Expressionsniveaus, während die Zelllinien der übrigen Tumorlokalisation keine oder nur geringe Levels aufwiesen [Xia et al., 1997]. Vor diesem Hintergrund vermuteten sie eine HER2-Überexpression als abgrenzendes Charakteristikum der oralen Karzinome und sahen darin möglicherweise begründet, dass vorangegangene Studien an HNSCC allgemein vielfach keinen prognostischen Wert für HER2-Überexpression zeigen konnten. Jedoch vermochten aktuellere Studien auch an gemischten HNSCC-Kollektiven eine prognostische Signifikanz für die HER2-Expression zu demonstrieren [Cavalot et al., 2007]. Auch die vorliegende Studie spricht für die HER2-Rezeptorexpression als Prognosemarker im HNSCC-Kollektiv, jedoch nicht für die Lokalisation Mundhöhle, für die sich andererseits der HER1-Status als prognostisch relevant herausstellte.

In einer weiteren Studie an Zelllinien stellte die Arbeitsgruppe um Xia et al. bei zwar ähnlichen Expressionsmustern für EGFR Unterschiede in der HER3-Expression zwischen OSCC und anderen HNSCC fest [Xia et al., 1999]. Auch diese Beobachtung konnte die vorliegende

Studie nicht bestätigen. Denn in beiden Kollektiven war eine EGFR-Überexpression relativ häufig, während eine HER3-Überexpression nicht vorkam. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse könnte verschiedene Gründe haben. Zum einen liegen unterschiedliche Detektionsmethoden (Western Blot versus Immunhistochemie) zu Grunde. Zum anderen steht bei diesem Vergleich eine Studie an Zelllinien einer Studie an echten Tumorgewebeproben gegenüber. Ein Problem konzeptioneller Art stellt sicherlich der große Unterschied hinsichtlich der Fallzahlen (219 Fälle im HNSCC-Kollektiv versus 23 Fälle im OSCC-Kollektiv) in der vorliegenden Analyse dar. Aufgrund dieser Schwäche der Studie ist die statistische Aussagekraft natürlich in gewisser Weise limitiert.

Auch genetische Veränderungen betreffend wurde über lokalisationspezifische Befunde in HNSCC berichtet. Huang et al. konstruierten auf Basis verschiedener detektierter chromosomaler Abberationen lokalisationsabhängige Modelle für onkogenetische Pfade der Tumorprogression für die untersuchten HNSCC-Subgruppen [Huang et al., 2002]. Auch Rodrigo et al. wiesen vor dem Hintergrund vielfältiger genetischer Untersuchungen auf die unterschiedliche Tumorbiologie der verschiedenen HNSCC-Lokalisationen hin und schlugen eine Betrachtung als jeweils eigenständige Entität vor [Rodrigo et al., 2001]. In Bezug auf den HER1-Genstatus konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Tumorlokalisationen festgestellt werden. Allerdings wurden in dieser Studie die Lokalisationen Larynx, Oropharynx und Hypopharynx auf jeweils intrinsische Aberrationen untersucht. Die vorliegende Studie fasste diese drei Regionen jedoch zu einer Gruppe zusammen und stellte sie der Lokalisation Mundhöhle gegenüber. Auch Freier et al. fanden lokalisationsabhängige Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit von Onkogen-Amplifikationen bei HNSCC, jedoch wiederum ohne Signifikanz für HER1 und HER2 [Freier et al., 2003]. Eine Studie von Takes et al. ergab, dass Larynxkarzinome signifikant niedrigere EGFR-Levels aufweisen sollen als die Lokalisationen Pharynx und Mundhöhle [Takes et al., 1998]. Dieser Vergleich wurde wiederum in der vorliegenden Studie nicht angestellt.

Trotz fehlender signifikanter Unterschiede in der vorliegenden Studie stellt sich besonders in Zusammenschau mit den anderen Berichten die Frage, ob die vielfach gehandhabte Betrachtung aller Lokalisationen als gemeinsame Entität (noch) gerechtfertigt ist. Sicherlich müssen die beschriebenen Studien einschließlich der vorliegenden aber auch kritisch betrachtet werden. Die Fallzahlen der verschiedenen Tumorlokalisationen wichen oft stark voneinander ab. Noch entscheidender ist womöglich die Verteilung der verschiedenen klinisch-pathologischen Parameter wie T-, N- und M-Stadium auf die verschiedenen Lokalisationen. Zum Beispiel

zeigten Freier et al. für Pharynxkarzinome signifikant höhere Amplifikationsraten von CCND1 [Freier et al., 2003]. Bei diesen Karzinomen lag aber der Anteil der Stadium IV-Tumoren bei über 80 %, während bei den anderen Lokalisationen ein geringer Anteil an fortgeschrittenen Tumorstadien vorlag. Möglicherweise war das Ergebnis durch dieses Missverhältnis mitbedingt, weshalb eine vorsichtige Interpretation geboten ist.

Grundsätzlich ist aber der Ansatz, lokalisationsspezifische Aberrationen zu untersuchen, zu befürworten. Denn gerade aufgrund möglicher klinischer, therapeutischer und prognostischer Konsequenzen wird das detaillierte Verständnis der für Initiation und Progression maligner Erkrankungen jeweils verantwortlichen Zusammenhänge immer wichtiger.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

### **Hintergrund:**

Untersuchungen von Rezeptortyrosinkinasen der humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor(HER)-Familie stehen im Fokus der modernen Tumorforschung. HER-Rezeptoren üben auf zellulärer Ebene Einfluss auf Proliferation und Wachstum, Migration und Adhäsion, aber auch auf Zellüberleben und Zelltod (Apoptose) aus. Tumorpathologisch spielen sie eine Rolle bei der Karzinogenese, Tumorprogression und Metastasierung. Die vier verwandten Rezeptoren HER1 (EGFR, epidermal growth factor receptor, epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor), HER2/neu (ERBB2, erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, virales Onkogen Homolog 2 der erythroblastischen Leukämie), HER3 und HER4 zeichnet ein großes Potential zur Molekülinteraktion untereinander aus (laterale oder horizontale Signaltransduktion), wodurch sie zahlreiche intrazelluläre Signalwege triggern und modulieren (vertikale Signaltransduktion). Damit stellen sie ein komplexes, funktionelles System dar, das zum Teil bereits tumortherapeutisch im Rahmen von Antigen-spezifischen Therapien genutzt wird. Auch auf dem Gebiet der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma) wurde der EGFR als potentieller therapeutischer Angriffspunkt erkannt. Die prognostische Bedeutung der HER in HNSCC wurde bislang kontrovers diskutiert.

Die vorliegende Studie analysiert erstmals alle vier Rezeptoren in einem größeren Kollektiv von HNSCC auf Gen- und Proteinebene hinsichtlich ihrer prognostischen Wertigkeit.

### **Tumorproben und Methoden:**

In der vorliegenden Studie wurden an einem Kollektiv von insgesamt 242 HNSCC-Tumorproben verschiedener Lokalisationen alle vier Rezeptoren der HER-Familie sowohl auf DNA-Ebene mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) als auch auf Proteinebene mittels Immunhistochemie (IHC) untersucht. Retrospektiv wurde der prognostische Wert des Gen- und Zentromerstatus sowie des Expressionsprofils der Rezeptoren HER1-4 respektive ihrer Chromosomen ermittelt.

Einer zuvor von den übrigen Tumorlokalisationen (Larynx und Pharynx; n = 219) getrennten Analyse der oralen Plattenepithelkarzinome (OSCC, oral squamous cell carcinomas; n = 23) folgte im Anschluss ein Vergleich dieser beiden Gruppen.

**Ergebnisse:**

**HNSCC-Kollektiv:** Eine immunhistochemisch detektierte Rezeptorüberexpression von HER1 und HER2 lag in 49,4 % bzw. 6,6 % der Fälle vor. Hinsichtlich HER3 und HER4 wurde in keinem der untersuchten Fälle eine Überexpression auf Proteinebene festgestellt. Die FISH-Analyse ergab in 5,2 % eine Genamplifikation des HER1-Lokus, während keiner der Tumoren eine Amplifikation der Loci HER2-4 aufwies. Univariate Überlebensanalysen zeigten neben der prognostischen Signifikanz bekannter etablierter Marker (fortgeschrittenes lokales Tumorstadium [T-Stadium], positiver Nodalstatus [N-Stadium], positiver Residualtumor [R-Stadium]) auch signifikant einen negativen Prognoseeinfluss für eine hohe HER2-Expression ( $p < 0,01$ ), eine hohe proliferative Aktivität (gemessen über die Ki-67-Expression;  $p = 0,02$ ) und eine chromosomale Instabilität, definiert als geringe oder hohe Polysomie in mindestens drei der vier untersuchten Chromosomen ( $p = 0,03$ ). Eine HER1-Überexpression und die damit signifikant assoziierte HER1-Amplifikation erwiesen sich nicht als prognostisch bedeutsam. In der anschließenden multivariaten Analyse setzte sich die R-Positivität als der prognostisch bedeutsamste Parameter durch ( $HR = 7,401$ ;  $p < 0,01$ ), gefolgt von einer hohen HER2-Expression ( $HR = 3,405$ ;  $p < 0,01$ ), einer chromosomalen Instabilität ( $HR = 1,852$ ;  $p = 0,03$ ) und einem fortgeschrittenem T-Stadium ( $HR = 1,035$ ;  $p < 0,01$ ).

**OSCC-Kollektiv:** Die immunhistochemische Analyse ergab in 30,4 % eine HER1-Überexpression mit sehr hohen Immunhistochemie-Score-Werten in 17,4 %. Die übrigen Rezeptoren waren nie überexprimiert. Über FISH wurde in 8,7 % der Fälle eine Amplifikation des HER1-Lokus detektiert. Es zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen HER1-Amplifikation und sehr hoher HER1-Rezeptorüberexpression. Eine Amplifikation der Genloci von HER2-4 kam nicht vor. Univariate Überlebensanalysen ergaben einen signifikanten negativen Prognoseeinfluss für fortgeschrittene Tumorstadien und ein höheres Patientenalter. Des Weiteren waren sowohl die HER1-Überexpression als auch die HER1-Amplifikation signifikant mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ( $p$  jeweils  $< 0,01$ ). In der multivariaten Analyse setzte sich die HER1-Ratio als prognostisch bedeutsamster und einziger signifikanter Parameter durch ( $HR = 10,809$ ;  $p = 0,02$ ), gefolgt vom Tumorstadium ( $HR = 1,057$ ;  $p = 0,05$ ).

**Vergleich der beiden Kollektive:** Ein anschließender Vergleich der immunhistochemischen und zytogenetischen Daten ergab gewisse Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten lokalisationsstypischen Assoziationen. Wiederholte, hinsichtlich der eingeschlossenen Parameter besser vergleichbare multivariate Analysen demonstrierten wiederum den HER2-Status auf Proteinebene für das HNSCC-Kollektiv sowie

den HER1-Status auf DNA-Ebene (Gen/Zentromer-Ratio) für das OSCC-Kollektiv als starke negative Prognosefaktoren.

### **Schlussfolgerungen:**

- In HNSCC stellen die HER2-Überexpression und die chromosomale Instabilität relevante, von den meisten gängigen Prognosemarkern unabhängige Prognosefaktoren dar.
- In OSCC spielt der HER1-Status eine Rolle als unabhängiger Prognosemarker. Dabei sind sowohl die Rezeptorüberexpression auf Proteinebene als auch die Amplifikation auf DNA-Ebene von prognostischer Bedeutung.
- Die OSCC unterscheiden sich in Expressions- und Genstatus der Wachstumsfaktorrezeptoren von HNSCC anderer Lokalisation, jedoch ohne statistische Signifikanz.

### **Ausblick:**

Die starke Vernetzung der unterschiedlichen Signalwege, in die die Rezeptoren eingebunden sind, die Akkumulation multipler molekularer Aberrationen und die genetische Plastizität in HNSCC tragen zu einer noch nicht hinreichend verstandenen Tumorbilogie bei. Gerade auch im Hinblick auf eine therapeutische Nutzung sind in Zukunft noch weitere Studien erforderlich, um die prognostische Bedeutung des Zusammenspiels der Rezeptortyrosinkinasen der HER-Familie näher zu definieren und um aktuell vorhandene Limitationen auf dem Gebiet zielgerichteter biologischer Therapien zu bewältigen.



## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ah-See KW, Cooke TG, Pickford IR, Soutar D, Balmain A: An allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck using microsatellite markers. *Cancer Res* 54:1617-1621, 1994
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press, Lyon 2005
- Baselga J, Arteaga CL: Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer (Review). *J Clin Oncol* 23:2445-2459, 2005
- Becker N, Wahrendorf J: Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981 – 1990. Springer, Berlin Heidelberg New York 1998  
und: Fortschreibung im Internet: [www.krebsatlas.de](http://www.krebsatlas.de)
- Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Hentschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Stabenow R, Stegmaier C, Ziegler H: Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trends. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) und das Robert- Koch-Institut (RKI), Saarbrücken 2006
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK: Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 354:567-578, 2006
- Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, Correo R, Eby YJ, Ruppert JM, Sidransky D: The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 53:4477-4480, 1993
- Braakhuis BJ, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH: Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck* 24:198-206, 2002
- Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM: Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 38:99-166, 2002
- Brown DC, Gatter KC: Ki67 protein: the immaculate deception? (Review). *Histopathology* 40:2-11, 2002
- Burstein HJ: The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *New Engl J Med* 353:1652-1654, 2005
- Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D: Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56:2488-2492, 1996
- Cantley LC: The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway (Review). *Science* 296:1655-1657, 2002
- Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA, Jr., Varella-Garcia M: Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 97:643-655, 2005

- Cavalot A, Martone T, Roggero N, Brondino G, Pagano M, Cortesina G: Prognostic impact of HER-2/neu expression on squamous head and neck carcinomas. *Head Neck* 29:655-664, 2007
- Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN: AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: Kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation (Review). *Annu Rev Biochem* 68:965-1014, 1999
- Charuruks N, Shin DM, Voravud N, Ro JY, Hong WK, Hittelman WN: P53 expression and polysomies of chromosome 9, 17 in head and neck cancer prognosis. *J Medical Assoc Thai* 82:466-476, 1999
- Chiang WF, Liu SY, Yen CY et al: Association of epidermal growth factor receptor (EGFR) copy number amplification with neck lymph node metastasis in areca-associated oral carcinomas. *Oral Oncol* 44:270-276, 2008
- Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, Jarrett C, Carter J, Murphy BA, Netterville J, Burkey BB, Sinard R, Cmelak A, Levy S, Yarbrough WG, Slebos RJ, Hirsch FR: Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol* 24:4170-4176, 2006
- Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, Hamilton A, Pan D, Schrag D, Schwartz L, Klimstra DS, Fridman D, Kelson DP, Saltz LB: Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 23:1803-1810, 2005
- Cobb MH, Goldsmith EJ: How MAP kinases are regulated (Review). *J Biol Chem* 270:14843-14846, 1995
- Colditz G, DeJong W, Hunter D, Trichopoulos D, Willett W (Eds.): Harvard Report on Cancer Prevention, Volume 1: Causes of human Cancer. *Cancer Causes Control* 7(Suppl 1):S3-S9, 1996
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E: Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*: 351:337-345, 2004
- Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P (Eds.): Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX. IARC Scientific Publication No. 160. IARC Press, Lyon 2007  
Im Internet verfügbar unter: [www-dep.iarc.fr](http://www-dep.iarc.fr)
- Dabbs DJ (Ed.): Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Application, 3<sup>rd</sup> ed. Saunders, Philadelphia 2010
- De Potter CR, Beghin C, Makar AP, Vandekerckhove D, Roels HJ: The neu-oncogene protein as predictive factor for haematogenous metastases in breast cancer patients. *Int J Cancer* 45:55-58, 1990
- De Potter CR, Quatacker J, Aertens G, Van Daele S, Pauwels C, Verhofstede C, Eechaute W, Roels HJ: The subcellular localization of the neu protein in human normal and neoplastic cells. *Int J Cancer* 44:969-974, 1989

- Diniz-Freitas M, Garcia-Caballero T, Antunez-Lopez J, Gandara-Rey JM, Garcia-Garcia A: Pharmacodiagnostic evaluation of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 13:285-290, 2007
- Earp HS, Dawson TL, Li X, Yu H: Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: A new signalling paradigm with implications for breast cancer research (Review). *Breast Cancer Res Treat* 35:115-132, 1995
- Field JK, Pavelic ZP, Spandidos DA, Stambrook PJ, Jones AS, Gluckman JL: The role of the p53 tumour suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 119:1118-1122, 1993
- Field JK, Spandidos DA, Yiagnisis M, Gosney JR, Papadimitriou K, Stell PM: C-erbB-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 12:613-619, 1992
- Fischer C, Zlobec I, Stockli E, Probst S, Storck C, Tornillo L, Lugli A, Wolfensberger M, Terracciano L: Is immunohistochemical epidermal growth factor receptor expression overestimated as a prognostic factor in head-neck squamous cell carcinoma? A retrospective analysis based on a tissue microarray of 365 carcinomas. *Hum Pathol* 39:1527-1534, 2008
- Freier K, Joos S, Flechtenmacher C, Devens F, Benner A, Bosch FX, Lichter P, Hofele C: Tissue microarray analysis reveals site-specific prevalence of oncogene amplifications in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 63:1179-1182, 2003
- Gillison ML: Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity (Review). *Semin Oncol* 31:744-754, 2004
- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D: Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 92:709-720, 2000
- González MV, Pello MF, López-Larrea C, Suárez C, Menéndez MJ, Coto E: Deletion and methylation of the tumour suppressor gene p16/CDKN2 in primary head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 50:509-512, 1997
- Goon PK, Stanley MA, Ebmeyer J, Steinsträsser L, Upile T, Jerjes W, Bernal-Sprekelsen M, Görner M, Sudhoff HH: HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head Neck Oncol* 1:36-43
- Grandis JR, Tweardy DJ: Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 53:3579-84, 1993
- Graus-Porta D, Beerle RR, Daly JM, Hynes NE: ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signalling. *EMBO J* 16:1647-1655, 1997
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC: Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54:4855-4878, 1994
- Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL: Insect cell-expresses p180<sup>erbB3</sup> possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci* 91:8132-8136, 1994
- Hardisson D: Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma (Review). *Eur Arch Otorhinolaryngol* 260:502-508, 2003

- Hass HG, Schmidt A, Nehls O, Kaiser S: DNA ploidy, proliferative capacity and intratumoral heterogeneity in primary and recurrent head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) – potential implications for clinical management and treatment decisions. *Oral Oncol* 44:78-85, 2008
- Heiss P: Untersuchungen zur Korrelation von Interaktionen der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aus der EGFR-Familie und Zellzykluskinetiken. Diplomarbeit, angefertigt am Institut für Pathologie der Universität Regensburg, 2000
- Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Negoro K, Fujita S: Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res* 12:87-91, 2006
- Hitt R, Ciruelos E, Amador ML, Benito A, Sanchez JJ, Ballestin C, Cortes-Funes H: Prognostic value of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and p53 in advanced head and neck squamous cell carcinoma patients treated with induction chemotherapy. *Eur J Cancer* 41:453-460, 2005
- Hoffman HT, Karnell LH, Funk GF, Robinson RA, Menck HR: The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124:951-962, 1998
- Hou L, Shi D, Tu SM, Zhan HZ, Hung MC, Ling D: Oral cancer progression and c-erbB-2/neu proto-oncogene expression. *Cancer Lett* 65:215-220, 1992
- Huang Q, Yu GP, McCormick SA, Mo J, Datta B, Mahimkar M, Lazarus P, Schäffer AA, Desper R, Schantz SP: Genetic differences detected by comparative genomic hybridization in head and neck squamous cell carcinomas from different tumor sites: construction of oncogenetic trees for tumor progression. *Genes Chromosomes Cancer* 34:224-33, 2002
- Hussain SP, Harris CC: Molecular epidemiology of human cancer: Contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* 58:4023-4037, 1998
- Hynes NE, Stern DF: The biology of erbB2/neu/HER2 and its role in cancer (Review). *Biochim Biophys Acta* 1198:165-184, 1994
- Irish J, Bernstein A: Oncogenes in head and neck cancer. *Laryngoscope* 103 (1 Pt 1):42-52, 1993
- Ishitoya J, Toriyama M, Oguchi N, Kitamura K, Ohshima M, Asano K, Yamamoto T: Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer*. 59:559-62, 1989
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ: Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol* 17:1983-1987, 1999
- Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW: Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling (Review). *Exp Cell Res* 284:31-53, 2003
- Kalyankrishna S, Grandis JR: Epidermal Growth Factor Receptor Biology in Head and Neck Cancer (Review). *J Clin Oncol* 24:2666-2672, 2006
- Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y: ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer, *EMBO J* 15:254-264, 1996

- Kearsley JH, Leonard JH, Walsh MD, Wright GR. A comparison of epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erbB-2 oncogene expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Pathology* 23:189-94, 1991
- Khademi B, Shirazi FM, Vasei M, Doroudchi M, Gandomi B, Modjtahedi H, Pezeshki AM, Ghaderi A: The expression of p53, c-erbB-1 and c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head and neck tumors. *Cancer Lett* 184:223-230, 2002
- Khan AJ, King BL, Smith BD, Smith GL, DiGiovanna MP, Carter C, Haffty BG: Characterization of the HER-2/neu oncogene by immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 8:540-548, 2002
- Kiyota A, Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, Ueyama Y, Matsumura T, Todd R, Wong DTW: Expression of a truncated epidermal growth factor receptor in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 161:9-15, 2000
- Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y: Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signalling network of growth factor receptors (Review). *Adv Cancer Res* 77:25-79, 2000
- Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG: Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumour entity? *Med Microbiol Immunol* 192:129-132, 2003
- Koch WM, Brennan JA, Zahurak M, Goddman SN, Westra WH, Schwab D, Yoo GH, Lee DJ, Forastiere AA, Sidransky D: P53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 88:1580-1586, 1996
- Kyriakis JM: Making the connection: coupling of stress-activated ERK/MAPK (extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) core signalling modules to extracellular stimuli and biological responses (Review). *Biochem Soc Symp* 64:29-48, 1999
- Lemmon MA, Schlessinger J: Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization (Review). *Trends Biochem Sci* 19:459-463, 1994
- Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E, Waterman H, Sela M, van Zoelen EJ, Yarden Y: Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ERBB tyrosine kinases confers signalling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J* 17:3385-3397, 1998
- Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, Mayer RJ, Gold P, Stella P, Mirtsching B, Cohn AL, Pippas AW, Azarnia N, Tsuchihashi Z, Mauro DJ, Rowinsky EK: Multicenter Phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol* 24:4914-4921, 2006
- Leonard J, Kearsley J, Chenevix-Trench G, Hayward N: Analysis of gene amplification in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 48:511-515, 1991
- Leong A, Cooper K, Leong F: Manual of diagnostic antibodies for Immunohistology, 2<sup>nd</sup> ed. Greenwich Medical Media, London 2003
- Looi ML, Dali AZ, Ali SA, Ngah WZ, Yusof YA: Expression of p53, bcl-2 and Ki-67 in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Anal Quant Cytol Histol* 30:63-70, 2008

- Lottner C, Schwarz S, Diermeier S, Hartmann A, Knuechel R, Hofstaedter F, Brockhoff G: Simultaneous detection of HER2/neu gene amplification and protein overexpression in paraffin-embedded breast cancer. *J Pathol* 205:577-584, 2005
- McCann AH, Dervan PA, O'Regan M, Codd MB, Gullick WJ, Tobin BM, Carney DN: Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res* 51:3296-3303, 1991
- Mendelsohn J, Baselga J: Status of Epidermal Growth Factor Receptor Antagonists in the Biology and Treatment of Cancer (Review). *J Clin Oncol* 21:2787-2799, 2003
- Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, Derynck R: Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376:337-341, 1995
- Miracca EC, Kowalski LP, Nagai MA: High prevalence of p16 genetic alterations in head and neck tumours. *Br J Cancer* 81:677-683, 1999
- Mirlacher M, Storz M: Gewebe-Chips für die molekulare Untersuchung von Tumoren. *Histo Journal* 19:7-17, 2000
- Moch H, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G: Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Advances in Anatomic Pathology* 8:14-20, 2001
- Nagai MA: Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas (Review). *Braz J Med Biol Res* 32:897-904, 1999
- O-charoenrat P, Modjtahedi H, Rhys-Evans P, Court WJ, Box GM, Eccles SA: Epidermal growth factor-like ligands differentially upregulate matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 60:1121-1128, 2000(1)
- O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Archer DJ, Eccles SA: C-erbB receptors in squamous cell carcinomas of the head and neck: clinical significance and correlation with matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factors. *Oral Oncol* 38:73-80, 2002(1)
- O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Court WJ, Box GM, Eccles SA: Differential modulation of proliferation, matrix metalloproteinase expression and invasion of human head and neck squamous carcinoma cells by c-erbB ligands. *Clin Exp Metastasis* 17:631-639, 1999
- O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles S: Characterization of ten newly-derived human head and neck squamous carcinoma cell lines with special reference to c-erbB proto-oncogene expression. *Anticancer Res* 21:1953-63, 2001
- O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Modjtahedi H, Eccles SA: The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma (Review). *Oral Oncology* 38:627-640, 2002(2)
- O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Modjtahedi H, Eccles SA: Vascular endothelial growth factor family members are differentially regulated by c-erbB signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 18:155-161, 2000(2)
- Österreichische Gesellschaft für Chirurgische Onkologie (ACO-ASSO).  
Kapitel Kopf/Hals-Malignome  
Im Internet verfügbar unter:  
[http://www.aco-asso.at/manual/archiv/kopfhals/kap\\_d.html#](http://www.aco-asso.at/manual/archiv/kopfhals/kap_d.html#)

- Oncology Announcements: FDA Approves Cetuximab to treat Head and Neck Cancer. *Oncology* 20, 2006
- Oya R, Ikemura K: Can flow cytometrically determined DNA ploidy and S-phase fraction predict regional metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity? *Head Neck* 24:136-142, 2002
- Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ: Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 18:3651-3664, 2000
- Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ: Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 13:63-72, 1996
- Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP: Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 79:595-604, 1997
- Perez-Ordoñez B, Beauchemin M, Jordan RC: Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck (Review). *J Clin Pathol* 59:445-453, 2006
- Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ: Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res* 54:2771-2777, 1994
- Press MF, Sauter G, Bernstein L, Villalobos IE, Mirlacher M, Zhou JY, Wardeh R, Li YT, Guzman R, Ma Y, Sullivan-Halley J, Santiago A, Park JM, Riva A, Slamon DJ: Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res* 11:6598-6607, 2005
- Preuss SF, Weinell A, Molitor M et al: Survivin and epidermal growth factor receptor expression in surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 30:1318-1324, 2008
- Raybaud-Diogenè H, Tétu B, Morency R, Fortin A, Monteil RA: P53 overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 32B:143-149, 1996
- Raybaud H, Odin G, Fafet A, Santini J, Monteil RA: Anomalies géniques dans les carcinomas épidermoïdes des voies aérodigestives supérieures: analyse de la littérature internationale (Revue générale) [Genic alterations in oral an head and neck squamous cell carcinomas: analysis of international literature (Revue)]. *Pathologie Biologie* 51:176-184, 2003
- Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ et al: Combined analysis of hpv-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer* 120:1731-1738, 2007
- Riese DJ, Gallo RM, Settleman J: Mutational activation of ERbB family receptor tyrosine kinases: insights into mechanisms of signal transduction and tumorigenesis (Review). *BioEssays* 29: 558-565, 2007
- Riese DJ, Stern DF: Specificity within the EGF family/ERbB receptor family signaling network (Review). *BioEssays* 20:41-48, 1998

- Ringström E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT: Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 8:3187-3192, 2002
- Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, Turek LP, Haugen TH: Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* Apr 10; 104:336-433, 2003
- Robbins KT, Shaha AR, Medina JE, Califano JA, Wolf GT, Ferlito A, Som PM, Day TA: Consensus statement on the classification and terminology of neck dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 134:536-538, 2008
- Rodrigo JP, Lazo PS, Ramos S, Alvarez I, Suárez C: MYC amplification in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122:504-507, 1996(1)
- Rodrigo JP, Ramos S, Lazo PS, Alvarez I, Suárez C: Amplification of ERBB oncogenes in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Eur J Cancer* 32A:2004-2010, 1996(2)
- Rodrigo JP, Suárez C, González MV, Lazo PS, Ramos S, Coto E, Alvarez I, García LA, Martínez JA: Variability of Genetic Alterations in different sites of head and neck cancer. *Laryngoscope* 111:1297-301, 2001
- Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R: EGFR Targeting of Solid Tumors (Review). *Cancer Control* 14:295-304, 2007
- Rogers SJ, Harrington KJ, Rhys-Evans P, O-Charoenrat P, Eccles SA: Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer (Review). *Cancer Metastasis Rev* 24:47-69, 2005
- Rubio Bueno P, Naval Gias L, García Delgado R, Romingo Cebollada J, Díaz González FJ: Tumor DNA content as a prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the oral cavity and tongue base. *Head Neck* 20:232-239, 1998
- Ryott M, Wangsa D, Heselmeyer-Haddad K, Lindholm J, Elmberger G, Auer G, Avall Lundqvist E, Ried T, Munck-Wikland E: EGFR protein overexpression and gene copy number increases in oral tongue squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 45:1700-1708, 2009
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies (Review). *Crit Rev Oncol Hematol* 19:183-232, 1995
- Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ: Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor: *J Clin Oncol* 22:1201-1208, 2004
- Sassen A, Rochon J, Wild P, Hartmann A, Hofstaedter F, Schwarz S, Brockhoff G: Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 10:R2, 2008
- Schartinger VH, Kacani L, Andrlé J, Schwentner I, Wurm M, Obrist P, Oberaigner W, Sprinzl GM: Pharmacodiagnostic value of the HER family in head and neck squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 66:21-26, 2004
- Scheer M, Prange W, Petmecky K, Schirmacher P, Zöller JE, Kübler AC: Überexpression/Amplifikation des her-2/neu-Protoonkogens in oralen Plattenepithelkarzinomen [Evalu-



tion of HER-2/neu amplification/overexpression in OSCC with fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 7:138-145, 2003

- Schwab M (Ed.): *Encyclopedia of Cancer*, 2<sup>nd</sup> ed., 2009
- Schwartz SR, Yueh B, McDougall JK, Daling JR, Schwartz SM: Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 125:1-9, 2001
- Scully C, Field JK, Tanzawa H: Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations (Review). *Oral Oncology* 36:311-327, 2000
- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W: Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; Clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6:963-968, 1953
- Shintani S, Funayama T, Yoshihama Y, Alcalde RE, Matsumura T: Prognostic significance of ERBB3 overexpression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 95:79-83, 1995
- Sibilio M, Wagner EF: Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269:234-238, 1995
- Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA, Kowalski LP, Graner E: Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-7 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol* 40:688-696, 2004
- Silva SD, Perez DE, Alves FA et al: ErbB2 and fatty acid synthase (FAS) expression in 102 squamous cell carcinomas of the tongue: Correlation with clinical outcomes. *Oral Oncol* 44:484-490, 2008
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-182, 1987
- Sliwkowski, MX, Schaefer G, Akita RW, Lofgren JA, Fitzpatrick VD, Nuijens A, Fendly BM, Cerione RA, Vandlen RL, Carraway KL: Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem* 269:14661-14665, 1994
- Smilek P, Dusek L, Vesely K, Rottenberg J, Kostrica R: Correlation of expression of Ki-67, EGFR, c-erbB-2, MMP-9, p53, bcl-2, CD34 and cell cycle analysis with survival in head and neck squamous cell cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 25:549-555; 2006
- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP: Age, sexual behaviour and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 108:766-772, 2004
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C: *TNM: Classification of Malignant Tumours*. 7th ed. John Wiley & Sons, New York 2009
- Stewart BW, Kleihues P (Eds.): *World Cancer Report*. WHO. International Agency for Research on Cancer. IARC Press, Lyon 2003  
Im Internet verfügbar unter: [www.scribd.com/doc/2350813/World-Cancer-Report-2003-Stuart-e-Kleihues-WHO-e-IARC](http://www.scribd.com/doc/2350813/World-Cancer-Report-2003-Stuart-e-Kleihues-WHO-e-IARC)
- Störkel S, Reichert T, Reiffen KA, Wagner W: EGFR and PCNA expression in oral squamous cell carcinomas – a valuable tool in estimating the patient's prognosis. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 29B:273-277, 1993

- Strome SE, Savva A, Brissett AE, Gostout BS, Lewis J, Clayton AC, McGovern R, Weaver AL, Persing D, Kasperbauer JL: Squamous cell carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. *Clin Cancer Res* 8:1093-1100, 2002
- Svetlovska D, Mardia J, Kristova V: Trastuzumab in the adjuvant treatment of breast Cancer. *Bratisl Lek Listy* 108:100-103, 2007
- Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuuring E, Litvinov SV, Hermans J, Van Krieken JH: Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res* 18:4793-800, 1998
- Taylor CR, Cote RJ (Eds.): *Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist*, 3<sup>rd</sup> ed. Saunders, Philadelphia 2006
- Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G: Tissue microarray for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 159:2249-2256, 2001
- Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunakaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y: A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 16:5276-5287, 1996
- Ullrich A, Schlessinger J: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity (Review). *Cell* 61:203-212, 1990
- Viallard JF, Lacombe F, Belloc F, Pellegrin JL, Reiffers J: Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire: aspects fondamentaux et implications en cancérologie [Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]. *Cancer Radiother* 5:109-129, 2001
- Vivanco I, Sawyers CL: The phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt pathway in human cancer (Review). *Nat Rev Cancer* 2:489-501, 2002
- Walker F, Abramowitz L, Benabderrahmane D, Duval X, Descatoire V, Hénin D, Lehy T, Aparicio T: Growth factor receptor expression in anal squamous lesions: modifications associated with oncogenic human papillomavirus and human immunodeficiency virus. *Human Pathol* 40:1517-1527, 2009
- Wallace-Brodeur RR, Lowe SW: Clinical implications of p53 mutations (Review). *Cell Mol Life Sci* 55:64-75, 1999
- Weinberg R: *The Biology of Cancer*. Taylor & Francis; Garland Science, 2007
- Werkmeister R, Brandt B, Joos U: The ErbB oncogenes as prognostic markers in oral squamous cell carcinomas. *Am J Surg* 172:681-683, 1996
- Wong S: Cetuximab: An Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody for the Treatment of Colorectal Cancer. *Clinical Therapeutics* 27:684-694, 2005
- Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Liu AR, Li L, Kiyokawa N, Clayman GL, Katz RL, Hung MC: Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 3:3-9, 1997
- Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Xiao FY, Johnston DA, Liu AR, Li L, Katz RL, Hung MC: Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral

squamous cell carcinoma than any individual family members. Clin Cancer Res 5:4164-4174, 1999

- Yarbrough WG, Shores C, Witsell DL, Weissler MC, Fidler ME, Gilmer TM: Ras mutations and expression in head and neck squamous cell carcinomas. Laryngoscope 104:1337-1347, 1994
- Yarden Y: Biology of HER2 and Its Importance in Breast Cancer (Review). Oncology 61:1-13, 2001(2)
- Yarden Y: The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities (Review). European Journal of Cancer 37(Suppl 4):S3-8, 2001(1)
- Yarden Y, Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signalling network (Review). Nat Rev Mol Cell Biol 2:127-137, 2001
- Yarden Y, Weinberg RA: Experimental approaches to hypothetical hormones. Detection of a candidate ligand of the neu protooncogene. Proc Natl Acad Sci 86:3179-3183, 1989
- Yeon CH, Pegram MD: Anti-erbB-2 antibody trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. Invest New Drugs 23:391-409, 2005

## 7. ANHANG

### 7.1. TNM-Klassifikationen und Stadiengruppierung

Das Ausmaß der Therapie und damit verbunden die Radikalität des chirurgischen Vorgehens richtet sich neben Entität und Lokalisation eines Tumors entscheidend nach dem jeweiligen Stadium der Tumorerkrankung. Aus diesem Grund ist eine präzise Klassifikation der Eigenschaften und der Ausbreitung des Tumors mit Hilfe klinischer und pathohistologischer Prognosefaktoren notwendig. Hierzu dient das sogenannte Staging. Grundlage des Stagings ist die TNM-Klassifikation maligner Tumoren der UICC (Union Internationale Contre le Cancer). Es beruht auf der Beschreibung der Größe und Ausdehnung einer Tumorerkrankung in drei Hauptkategorien:

- **T-Kategorie:** Lokale Ausbreitung des Primärtumors
- **N-Kategorie:** Fehlen oder Vorhandensein und Ausbreitung von regionären Lymphknotenmetastasen
- **M-Kategorie:** Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen

Im Folgenden werden die TNM-Klassifikationen der HNSCC aufgeführt. Der T-Status orientiert sich an den jeweiligen anatomischen Strukturen der verschiedenen Primärtumorlokalisationen. N- und M-Status gelten jeweils für alle Lokalisationen aus dem Spektrum der HNSCC (**Tabelle 17**). Nach der Festlegung der drei Kategorien können diese zu Stadien gruppiert werden (**Tabelle 18**).

**Tabelle 17:** TNM-Klassifikationen der HNSCC (Sobin et al., 2009)

#### **Lokale Ausbreitung des Primärtumors (T-Kategorie)**

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ

#### **Larynxkarzinom**

##### **Supraglottis**

T1	Tumor auf einen Unterbezirk der Supraglottis* begrenzt, mit normaler Stimmlippenbeweglichkeit
T2	Tumor infiltriert Schleimhaut von mehr als einem Unterbezirk der Supraglottis* oder Glottis oder eines Areals außerhalb der Supraglottis (z. B. Schleimhaut von Zungengrund, Vallecula, mediale Wand des Sinus pyriformis), ohne Fixation des Larynx
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation und/oder Tumor mit In-

- filtration des Postkrikoidbezirks, des präepiglottischen Gewebes und/oder geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
- T4a Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus, M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
- T4b Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna

### Glottis

- T1 Tumor auf Stimmlippe(n) begrenzt (kann auch vordere oder hintere Kommissur befallen), mit normaler Beweglichkeit
- a Tumor auf eine Stimmlippe begrenzt
- b Tumorbefall beider Stimmlippen
- T2 Tumor breitet sich auf Supraglottis und/oder Subglottis aus und/oder Tumor mit eingeschränkter Stimmlippenbeweglichkeit
- T3 Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation und/oder Invasion der Postkrikoidgegend und/oder des präepiglottischen Gewebes und/oder des paraglottischen Raumes mit geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
- T4a Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus, M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
- T4b Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna

### Subglottis

- T1 Tumor auf die Subglottis begrenzt
- T2 Tumor breitet sich auf eine oder beide Stimmlippen aus, diese mit normaler oder eingeschränkter Beweglichkeit
- T3 Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation
- T4a Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus, M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
- T4b Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna

### Oropharynxkarzinom

- T1 Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
- T2 Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
- T3 Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung oder Ausbreitung zur lingualen Oberfläche der Epiglottis
- T4a Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Lamina medialis des Processus pterygoideus, harten Gaumen oder Unterkiefer
- T4b Tumor infiltriert Nachbarstrukturen wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna

---

**Hypopharynxkarzinom**


---

T1	Tumor auf einen Unterbezirk des Hypopharynx** begrenzt und/oder 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor infiltriert mehr als einen Unterbezirk des Hypopharynx** oder einen benachbarten Bezirk oder misst mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung, ohne Fixation des Hemilarynx
T3	Tumor misst mehr als 4 cm in größter Ausdehnung oder Tumor mit Fixation des Hemilarynx
T4	Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Schild-/Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Weichteile des Halses
T4b	Tumor infiltriert prävertebrale Faszien, umschließt die A. carotis interna oder infiltriert Strukturen des Mediastinums

---

**Mundhöhlen- und Lippenkarzinom**


---

T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T4a	Lippe: Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen, den N. alveolaris inferior, in Mundhöhlenboden oder in Haut (Kinn oder Nase) Mundhöhle: Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen in äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b	Lippe und Mundhöhle: Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt A. carotis interna

---

**Regionäre Lymphknoten\*\*\* (N-Kategorie)**


---

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung
N2a	Metastase in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keine mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keine mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung

---

**Fernmetastasen (M-Kategorie)**


---

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

---

\* Regionen der Supraglottis: Suprahyoidale Epiglottis, Aryepiglottische Falte, Arythenoidgegend, Infrahyoidale Epiglottis, Taschenfalten

\*\* Regionen des Hypopharynx: Postkrikoidgegend, Sinus piriformis, Hypopharynxhinterwand

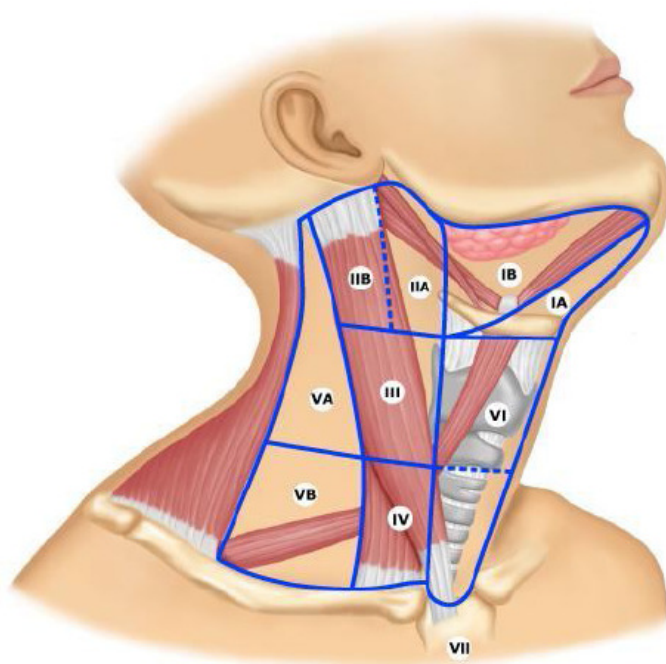
\*\*\* die regionären Lymphknoten sind die zervikalen Lymphknoten

**Tabelle 18:** Stadiengruppierung der HNSCC

Tumorstadium	T-Kategorie	N-Kategorie	M-Kategorie
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0
<b>II</b>	T2	N0	M0
<b>III</b>	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
<b>IVA</b>	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
<b>IVB</b>	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
<b>IVC</b>	Jedes T	Jedes N	M1

## 7.2. Klassifizierung der zervikalen Lymphknoten

Die heute international akzeptierte Terminologie und Klassifizierung der Halslymphknoten und der Neck Dissection-Verfahren der American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery beruht auf der Unterteilung der Halslymphknoten in sieben Gruppen (Level I bis VII) und weitere Sublevel in den Gruppen I, II und V anhand entsprechender anatomischer Leitstrukturen (**Abbildung 23** und **Tabelle 19**) [Robbins et al., 2008].



**Abbildung 23:** Lymphknoten-Level des Halses (nach Robbins et al., 2008).

**Tabelle 19:** Lymphknoten-Level des Halses (nach Robbins et al., 2008)

<b>Level I</b>	Trigonum submentale (IA) und submandibulare (IB)
<b>Level II</b>	Kraniojugular: medial des M. sternocleidomastoideus im oberen Halsdrittel von seinem Ansatz am Processus mastoideus nach kaudal bis in Höhe der Karotisgabel; medial (IIA) und lateral (IIB) des N. accessorius
<b>Level III</b>	Mediojugular: medial des M. sternocleidomastoideus im mittleren Halsdrittel kaudal von Level II bis zur Kreuzungsstelle des M. omohyoideus
<b>Level IV</b>	Kaudojugular: medial des M. sternocleidomastoideus im unteren Halsdrittel kaudal von Level III bis zur Clavicula



<b>Level V</b>	Posteriores Halsdreieck: dorsal des Hinterrandes des M. sternocleidomastoideus bis zum Vorderrand des M. trapezius; oberhalb (VA) und unterhalb des Ringknorpels (VB)
<b>Level VI</b>	Ventral der Regionen II, III und IV bis zur Mittellinie (kranioviszeral vom Zungenbein bis Sternum)
<b>Level VII</b>	Kraniomediastinal

---

### 7.3. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
AEV	Avian Erythroblastosis Virus
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Arf	Alternative reading frame-Protein (neben INK4a ein weiteres Genprodukt des INK4a/ARF-Lokus)
Bax	Bcl-2-associated X-Protein
bzgl.	bezüglich
Bcl-2	Genprodukt des B-cell lymphoma 2 -Onkogens
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CCD	Charge-Coupled Device
CD	Cluster of Differentiation
Cdk	Cyclin-dependent kinase
Chr Inst	Chromosomale Instabilität
CI	Konfidenzintervall
CIP	Cdk Inhibitory Proteins
CIS	Carcinoma in situ
Cki	Cyclin-dependent kinase inhibitor
CRC	Kolorektales Karzinom
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamin-2-Phenylindoldihydrochlorid
dd-PCR	differential display-PCR
d. h.	das heißt
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
DR	Death Receptor
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
et al.	et alteri (und andere)
Ets-Transkriptionsfaktor	benannt nach dem Vogel-Erythroblastose-Virus E26 („E-twenty-six“)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FDA	Food and Drug Administration

---

FHA	Forkhead Associated
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G	Gen
g	Gramm
G1-3	Differenzierungsgrad 1-3
G1-Phase	Gap1-Phase (Präsynthesephase im Zellzyklus)
G2-Phase	Gap2-Phase (Prämitosephase im Zellzyklus)
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
Hb EGF	Heparin-binding EGF-like Growth Factor
HCl	Hydrochlorid (Salzsäure)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HP	Hypopharynx
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	Hazard Ratio
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IHC	Immunhistochemie
INK4	Inhibitor of Kinase 4
JNK	JunNH <sub>2</sub> -terminale-Kinase
JÜR	Jahres-Überlebensrate
kD	Kilodalton
Ki-67	Kiel-67-Protein (benannt nach der deutschen Stadt Kiel)
L	Larynx
L	Liter
LOH	Loss of Heterozigosity
M	Molar
M.	Muskel
mAb	monoclonal Antibody
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
mCRC	Metastasiertes Kolorektales Karzinom
Mdm2	Genprodukt des Murine double minute 2-Gens
MEK	MAPK/ERK-Kinase
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar

---

mm	Millimeter
M-Phase	Mitosephase im Zellzyklus
mRNA	messenger-RNA
Myc	Genprodukt des Myelocytomatosi-Onkogens
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
N	normal
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydrogencarbonat
nm	Nanometer
NRG	Neuregulin
n.s.	nicht signifikant
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
OC	Oral Cavity
OP	Oropharynx
OSCC	Oral Squamous Cell Carcinoma
OT	Objektträger
pAb	polyclonal Antibody
PBS-Lösung	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Pidd	p53-induced protein with death domain
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PLC	Phospholipase C
Puma	p53-upregulated modulator of apoptosis
p-Wert	Signifikanzwert, engl. p-value von probability
p53Aip	p53-regulated apoptosis-inducing protein
Raf	Ras-activated factor
Ras	Genprodukt des Rat sarcoma-Proto-Onkogens
Rb	Genprodukt des Retinoblastomgens
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
SA	Sekundärantikörper

---

SAPK	Stress-Activated Protein-Kinase
SIL	Squamöse Intraepitheliale Läsion
SIN	Squamöse Intraepitheliale Neoplasie
S-Phase	Synthesephase im Zellzyklus
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SSC	Standard Saline Citrate
t-EGFR	truncated EGFR
TGF $\alpha$	Transforming Growth Factor $\alpha$
TM	Trademark
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumour, Node, Metastasis; Klassifikation zur Beschreibung des Primärherds, der Lymphknoten- und Fernmetastasen eines malignen Tumors
TSG	Tumorsuppressorgen
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
USA	United States of America
UV	ultraviolett
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
Y	Tyrosin
Z	Zentromer
z. B.	zum Beispiel

## PUBLIKATION

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde bereits wie folgt publiziert:

Brunner K, Fischer CA, Driemel O, Hartmann A, Brockhoff G, Schwarz S: *EGFR (HER) family protein expression and cytogenetics in 219 squamous cell carcinomas of the upper respiratory tract: ERBB2 overexpression independent prediction of poor prognosis.* Anal Quant Cytol Histol 32(2):78-89, 2010

## DANKSAGUNG

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hofstädter für die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Pathologie in Regensburg anfertigen zu können.

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Arndt Hartmann möchte ich mich ganz herzlich für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas bedanken.

Vom Universitätsspital Basel, Schweiz, bedanke ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. Luigi Terracciano, Abteilung für Pathologie, sowie Herrn Dr. Claude Fischer, Abteilung für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, für die freundliche Bereitstellung der Tumorproben sowie der klinisch-pathologischen Daten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Stephan Schwarz-Furlan für die exzellente und zuverlässige Betreuung meiner Arbeit. Ohne seine hoch geschätzte fachliche Kompetenz und ebenso professionelle wie engagierte und freundschaftliche Unterstützung wäre diese Arbeit so nicht entstanden. Ich bedanke mich an dieser Stelle für seine Hilfe bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen, seine Ratschläge zur Präsentation und Interpretation der Daten, für seine Erklärungen bei der statistischen Auswertung sowie ganz besonders für sein immer offenes Ohr bei Fragen und Problemen klinischer, histopathologischer oder statistischer Art. Trotz Standortwechsels nach Erlangen hat die Kommunikation immer hervorragend geklappt und der regelmäßige Austausch hat großen Anteil am Gelingen der Dissertation.

Ebenso danke ich Herrn PD Dr. Gero Brockhoff, ohne dessen Mamma-Projekt diese Arbeit an Kopf-Hals-Karzinomen wohl nicht zustande gekommen wäre. Nicht zuletzt wurden mir durch seine Arbeitsgruppe die FISH-Sonden sowie die Geräte zur mikroskopischen Auswertung zur Verfügung gestellt. Bei Anliegen und Fragen war ich ihm und seinen Mitarbeitern immer willkommen, wofür ich mich ganz herzlich bedanke.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken. Ein besonderes Dankeschön gilt an dieser Stelle Frau Marietta Bock und Herrn Rudolf Jung.

Schließlich möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinem früheren Mathematiklehrer Herrn Hermann Kurz für die Hilfe bei der Formatierung der Arbeit bedanken.

Nicht zuletzt gilt ein ganz besonderer Dank meinen Eltern, ohne deren langjährige vielseitige Unterstützung meine Ausbildung nicht möglich gewesen wäre.

---

## LEBENS LAUF

---

### Persönliche Daten

---

Name: Kathrin Brunner  
Geburtsdatum/-ort: 21. Januar 1984, Regensburg

---

### Schul Ausbildung

---

1990-1994 Volksschule Neuschönau  
1994-2003 Landgraf-Leuchtenberg-Gymnasium Grafenau; Abitur

---

### Hochschulausbildung

---

10/2003-12/2009 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg  
09/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
12/2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Praktisches Jahr

08-12/2008 Innere Medizin, Universitätsklinikum Regensburg  
(Pulmonologie, Kardiologie, Hämatologie/Onkologie)  
12/2008-01/2009 Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg  
(Unfallchirurgie)  
01-04/2009 Chirurgie, Inselspital Bern, Schweiz  
(Viszerale und Transplantationschirurgie, Thoraxchirurgie)  
04-06/2009 Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg

---

### Berufstätigkeit

---

seit 04/2010 Assistenzärztin am Institut für Pathologie,  
Universitätsklinikum Erlangen